

Karakterisering av nye væskemembraner i Hulfiber Væske-fase Mikroekstraksjon

Hamidreza Taherkhani



Faggruppen for legemiddelanalyse,

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi,

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet I Oslo

Vår2011

Karakterisering av nye væskemembraner i Hulfiber Væske-fase Mikroekstraksjon



Hamidreza Taherkhani

Masteroppgaven ble gjennomført ved faggruppen for Legemiddelanalyse, avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt ved Universitetet i Oslo perioden mars 2010 til mai 2011.

Veiledere: Professor Stig Pedersen-Bjergaard
Professor Knut Einar Rasmussen
Doktor Astrid Gjelstad

Forord

Jeg vil rette en stor takk til mine hovedveiledere; Professor Stig Pedersen-Bjergaard, Doktor Astrid Gjelstad og Professor Kunt Rasmussen for all støtte og utmerket veiledning, og ikke minst for tålmodigheten dere har vist gjennom hele mitt arbeid med masteroppgaven. Jeg er utrolig takknemlig for at det har aldri vært noe problem å spørre dere om råd og veiledning, og for at dere tar så godt vare på studentene deres.

Jeg vil også takke mine medelever Jeanette, Ragnhild og Karoline for en avslappende stemning og godt humør på hovedfagskontoret. Takk til analyseavdelingen ved farmasøytisk institutt som har bidratt med godt arbeidsmiljø.

Videre vil jeg takke mine gode venner Mai Pham og Ole Rostad som har lest korrektur på oppgaven.

Til slutt vil jeg takke min familie, mine foreldre og særlig min vakre kone Mozhgan og min skjønnne datter Viana, for all støtte og omsorg, og for at dere har bidratt med glede og hygge i mine travle hverdager.

Oslo, mai 2011

Hamidreza Taherkhani

Sammendrag

19 forskjellige løsemidler ble testet som væskemembran (Supported liquid membrane, SLM) i 3-fase hulfiber væske-fase mikroekstraksjon (Liquid-phase microextraction, LPME). Stabilitet av SLM ble undersøkt når de organiske fasene var immobilisert i porøse hulfibere. Løsemidler med kokepunkt over cirka 225 °C ble funnet å være stabile, på den måten at tap av SLM ved fordamping ikke var målbart 5 minutter etter immobilisering. Dette er svært viktig for å opprettholde integriteten til SLM under håndtering av hulfiber før LPME. Stabiliteten i de ulike SLM med hensyn til lekkasje i den vandige prøven og den vandige akseptorfasen ble også undersøkt. Løsemidler med vannløselighet under 100 µg/ml ble funnet å være stabile, slik at mer enn 97 - 99 % (w/w) av SLM var intakt etter LPME-prosessen for disse løsemidlene. Dette er viktig for å opprettholde integriteten til SLM under LPME, og for å unngå forurensning av akseptorfasen med organisk løsemiddel. Det foreliggende arbeidet har også vist at valg av type løsemiddel som brukes som SLM bør være relatert til hydrofobisitet av analytten. Når log P-verdien for analytten var høyere enn cirka 4, var selektiviteten av løsemiddelet funnet å være viktig. Løsemidler med relativt sterke protonakseptor og dipol egenskaper som tilhører gruppe VI (alifatisk ketoner og estere) eller gruppe VII (aromatiske hydrokarboner) av Snyders klassifiseringen av løsningsmidler, ble funnet å være de beste alternativene for basiske substanser. På den annen side, når log P for analytten var lavere enn cirka 4 var selektiviteten av løsemiddel mindre viktig. I dette arbeidet ble også effektiviteten av ulike fiberbehandlingsmetoder etter immobilisering av hulfiber i organisk fase undersøkt. Varierende resultater tyder på at den tradisjonelle papirtørkingen kanskje fortsatt er det beste alternativet for fjerning av overskudd av SLM på fiberen etter immobilisering. Det foreliggende arbeidet har også lansert flere nye og svært stabile løsemidler for implementering i fremtidige 3-fase LPME-applikasjoner. Isopentylbensen og neopentylbensen ble funnet å være svært effektive for LPME av utvalgte upolare basiske substanser, mens fenetol, isopentylbensen, dibutylftalat, og 3-nitrostyren ble funnet å være svært effektive for ekstraksjon av upolare sure stoffer.

Innhold

FORORD	3
SAMMENDRAG	4
INNHold	5
FORKORTELSER.....	8
1 INNLEDNING	11
1.1 Bakgrunn	11
1.2 LPME Historikk	12
1.2.1 Fordeler med LPME.....	13
1.3 Målsetting.....	14
2 TEORI	16
2.1 Prinsipp for LPME	16
3 EKSPERIMENTELT	22
3.1 Karakteristisk av analyserte substanser	22
3.2 Karakteristisk av kjemikalier	24
3.3 Instrumenter og betingelser	26
3.3.1 LPME	26
3.3.2 GC/MS	28
3.3.3 HPLC.....	31
3.3.4 CE.....	32
3.4 Tillaging av løsninger	34
3.4.1 Stamløsninger	34
3.4.1.1 Stamløsning for basiske stoffer	34

3.4.1.2	Stamløsning for sure stoffer	34
3.4.1.3	Organiske faser i pentan	34
3.4.1.4	Organiske faser i sykloheksan	34
3.4.2	Standardløsninger	36
3.4.2.1	10 µg/ml standardløsning av basiske stoffer	36
3.4.2.2	20 µg/ml standardløsning av sure stoffer	36
3.4.2.3	Standardløsninger for organiske faser i pentan	36
3.4.2.4	Standardløsninger for organiske faser i sykloheksan	37
3.4.3	Prøveløsninger	38
3.4.3.1	1 µg/ml prøveløsning av basiske stoffer i NaOH	38
3.4.3.2	1 µg/ml prøveløsning av sure stoffer i HCl	38
3.4.4	Akseptor og donor-faser	39
3.4.4.1	10 mM HCl, 250 ml	39
3.4.4.2	10 mM NaOH, 250 ml	39
3.4.5	Mobilfaser	39
3.4.6	Bufferløsninger	39
3.4.6.1	Acetatbuffer, 100 mM, pH = 4,4, 100 ml	39
3.4.6.2	Acetatbuffer, 100 mM, pH = 4,6, 100 ml	40
3.4.6.3	Acetatbuffer, 100 mM, pH = 4,8, 100 ml	40
3.4.6.4	Boratbuffer, 50mM, pH = 8,8	40
3.4.6.5	Natriumboratbuffer, 50 mM, pH = 8,5	40
3.4.6.6	Fosfatbuffer med beta-syklodeksterin, pH = 9	41
3.5	Prøveopparbeidelse	41
3.5.1	LPME-HPLC for beregning av utbytte på basiske legemidler	41
3.5.2	LPME-CE for beregning av utbytte på sure legemidler	41
3.5.3	LPME-GC/MS for beregning av lekkasje	42
3.5.4	Veieforsøk for beregning av fordampning av organisk fase i luft	42
3.6	Beregninger	43
3.6.1	Tap av SLM ved fordamping (%)	43
3.6.2	Utbytte(%)	43
3.6.3	Lekkasje(%)	44
4	RESULTATER OG DISKUSJON	45
4.1	Innledende forsøk	45

4.1.1	Stabilitetsforsøk av SLM når den er i kontakt med luft.....	46
4.1.2	Lekkasje av SLM i akseptor- og donorfase	48
4.1.3	Ekstraksjonsutbytte (%) av ulike SLM for basiske modellsubstanser	51
4.1.4	Ekstraksjonsutbytte (%) av ulike SLM for sure modellsubstanser	54
4.2	Optimaliseringsforsøk.....	56
4.2.1	Valg av løsningsmiddel for ekstraksjon av donor- og akseptorfase fra LPME i forbindelse med GC/MS	56
4.2.2	Fortynning av prøver før injeksjon i GC/MS	58
4.2.3	Valg av fiberbehandlingsmetode ved LPME.....	59
4.2.4	Valg og optimalisering av separasjonsbuffer for CE.....	61
4.3	Karakterisering av modellsubstanser i forhold til Snyders klassifikasjonssystem for løsemidler.....	64
	KONKLUSJON	66
5	KILDELISTE.....	67

Forkortelser

<i>Forkortelse</i>	<i>Forklaring</i>
<i>ACN</i>	<i>Acetonitril (Acetonitrile)</i>
<i>CE</i>	<i>Kapillærelektroforese (Capillary electrophoresis)</i>
<i>i.d.</i>	<i>Indre diameter (Internal diameter)</i>
<i>HPLC</i>	<i>Væskerkromatografi (High Performance Liquid Chromatography)</i>
<i>LPME</i>	<i>Væskefase mikroekstraksjon (Liquid Phase Micro extraction)</i>
<i>SDS</i>	<i>Natriumlaurylsulfat (Sodium dodecyl sulfate)</i>
<i>UV</i>	<i>Ultrafiolet (Ultraviolet)</i>
<i>SLM</i>	<i>Organisk væskemembran (Supported liquid membrane)</i>
<i>LLE</i>	<i>Væske-væske ekstraksjon (Liquid-liquid extraction)</i>
<i>GC</i>	<i>Gasskromatografi (Gass chromatography)</i>
<i>MS</i>	<i>Massespektrometri (Mass Spectrometry)</i>
<i>LC/MS</i>	<i>Væskerkromatografi/massespektrometri</i>

<i>NPOE</i>	<i>2-nitrofenyloktyleter</i>
<i>SPE</i>	<i>Fast-fase mikroekstraksjon (Solid-Phase Microextraction)</i>
<i>HCL</i>	<i>Saltsyre (Hydrochloric acid)</i>
<i>NaOH</i>	<i>Natriumhydroksid (Sodium hydroxide)</i>
<i>μm</i>	<i>Mikrometer (Micrometer)</i>
<i>mm</i>	<i>Millimeter (Millimeter)</i>
<i>ml</i>	<i>Milliliter (Milliliter)</i>
<i>mM</i>	<i>Millimolar (Millimolar)</i>
<i>μg</i>	<i>Mikrogram (microgram)</i>
<i>rpm</i>	<i>Revolusjon per minutt (Revolution per minute)</i>
<i>SIM</i>	<i>Selektiv ionemonitorering (Selective Ion Monitoring)</i>
<i>Na₂HPO₄</i>	<i>Natriumhydrogenfosfat (Disodium hydrogen phosphate)</i>
<i>DHE</i>	<i>Diheksyleter (Dihexyl ether)</i>
<i>UL</i>	<i>Ultralydbad</i>

<i>nd</i>	<i>Ikke detektert (non-detected)</i>
<i>Rad/s</i>	<i>Radian per sekund (Radians per second), (1000 rpm = 104,72 rad/s, eller 60 rpm = 2π Rad/s)</i>
<i>eV</i>	<i>Elektronvolt (Electronvolt)</i>
<i>m/z</i>	<i>Masse/ladning (mass to charge ratio)</i>
<i>v/v</i>	<i>Volum/volum (Volum/volum)</i>
<i>w/w</i>	<i>Vekt/vekt (Weight/weight)</i>
<i>kV</i>	<i>Kilovolt (Kilovolt)</i>
<i>psi</i>	<i>Pounds per kvadrattomme (Pounds per square inch)</i>

1 Innledning

1.1 Bakgrunn

Legemiddelanalyse av biologiske væsker som urin og plasma er ofte utfordrende og komplisert. Utfordringene er blant annet begrenset prøvevolum, lave analyttkonsentrasjoner og et stort antall matrikskomponenter som kan interferere i den videre analyse. Prøveopparbeidelse er derfor nødvendig for å oppkonsentrere analyttene til et nivå som kan detekteres, og for å isolere analyttene fra matrikskomponentene. Væske-væske ekstraksjon (LLE) og fast-fase ekstraksjon (SPE) har vært blant de viktigste og mest robuste prøveopparbeidelsesteknikker innen laboratorieanalyse.

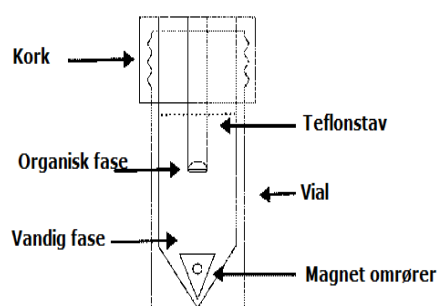
Prøveløsningen i LLE er vanligvis en vandig løsning og legemidlene ekstraheres over i et organisk løsemiddel som ikke er blandbar med vann eller vandige prøver. Fordelen ved LLE er at metoden gir forholdsvis rene ekstrakter. Ulempen med LLE er at forbruket av løsemidler er høyt, og metoden er svært tidskrevende. I tillegg er det også vanskelig å automatisere LLE-metoden [1].

SPE ble raskt en populær metode for prøveopparbeidelse både fordi det er mulig med stor variasjon i ekstraksjonskjemi, forbruket av organiske løsemidler er relativt lavt, og fordi den er lett å automatisere. I SPE retarderes analyttene på en liten kolonne mens matrikskomponenter vaskes ut. Deretter elueres legemidlene ut i et eget trinn. Ulempen med SPE er at metoden gir imidlertid liten mulighet for oppkonsentrering ved små prøvevolum [2].

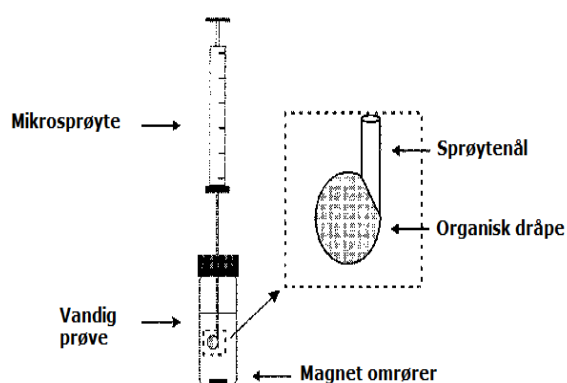
Det er av stor interesse å finne en metode for prøveopparbeidelse som kan kombinere det beste av de allerede etablerte metodene LLE og SPE. En metode som gir rene ekstrakter og god oppkonsentrering, og som i tillegg er lett å automatisere. Løsningen på mange av problemene kom med introduksjon av væskefase mikroekstraksjon (LPME), en miniaturisert form for LLE [3].

1.2 LPME Historikk

Væskefasemikroekstraksjon (Liquid-phase microextraction, LPME), ble utviklet i 1996. Denne metoden ble utviklet som et alternativ for LLE. Fordelen med metoden var at den var enkel, hurtig og billig, samtidig var forbruket av organiske løsemidler svært lavt [4]. Teknikken ble gjennomført ved at en liten dråpe ble suspendert inn i en vandig prøveløsning. Under ekstraksjonen ble den ønskede analytten ekstrahert fra prøveløsningen til den organiske dråpen. Etter ekstraksjon ble den organiske dråpen injisert direkte i gasskromatografi [5]. Metoden benyttes svært sjelden nå for tiden, grunnet lav stabilitet av dråpen, da denne fort kan oppløses i prøveløsningen [6]. Figur 1 presenterer singeldråpe mikroekstraksjon som ble introdusert for første gang, og figur 2 illustrerer den utviklede metoden av singeldråpe LPME.



Figur 1. Illustrasjon av singeldråpe mikroekstraksjonssystem som ble introdusert av Jeannot og Cantwell i 1996. Figuren er hentet fra [3].



Figur 2 Skjematisk representasjon av en annen singeldråpe mikroekstraksjonssystem, introdusert av Jeannot og Cantwell i 1997, hvor den organiske mikrodråpen er suspendert på tuppen av en mikrosprøyte. Figuren er hentet fra [5].

Pedersen-Bjergaard og Rasmussen klarte i 1999 å løse stabilitetsproblemet ved å utvikle metoden videre til LPME basert på polypropylen hulfiber. I dette konseptet skjer ekstraksjonen fra en vandig prøveløsning, via en organisk væskemembran (SLM) immobilisert i porene i veggen på en porøs hulfiber, og videre inn i hulrommet (lumen) av hulfiberen som er fylt med organisk eller vandig løsning [6].

1.2.1 Fordeler med LPME

Selv om LLE gir større utbytte enn LPME [1], har likevel interessen for bruk av LPME økt de siste årene, grunnet flere fordeler ved bruk av LPME sammenlignet med den tradisjonelle væske-væske ekstraksjonen (LLE).

For det første er forbruket av organiske løsemidler sterkt redusert, ettersom det ikke benyttes mer enn 5-30 µl for å fylle porene i fiberen ved forberedelse av SLM i den polymere membranen. Dette er gunstig med tanke på miljøet, reduksjon av toksisitet og av økonomiske hensyn [6]. Det er også mulig å bruke eteriske oljer som for eksempel mandelolje, soyaolje og peppermynteolje som et alternativt til SLM, noe som også er tryggere å bruke med tanke på arbeidsmiljø [7].

Dessuten er prøvevolumet ved bruk av LPME (50 µl opp til 1 liter) betraktelig større enn volumet av akseptorfasen, som vanligvis ligger mellom 2-30 µl. På grunn av den store volumforskjellen, kan man oppnå en høy oppkonsentreringsfaktor uten å ha behov for avdamping og gjennopløsning av stoffene [8]. Oppkonsentreringsfaktoren bestemmes av analyttens utbytte, prøvevolum og volum av akseptorfasen.

I tillegg overføres analyttene fra en vandig prøve til en SLM (organisk løsemiddel), og deretter videre ut i en ny vandig løsning (akseptorløsning) med ulike pH-forhold sammenlignet med prøven. Dette gjør LPME til en effektiv teknikk med høy selektivitet og utmerket prøveopprensing. LPME er en gunstig metode å benytte for å redusere eller eliminere eventuelle problemer fra en komplisert matriks, som for eksempel prøver fra miljøet eller biologiske prøver [8, 9].

En stor ulempe med kvantitative kromatografiske analyser basert på LC/MS er undertrykkelse av signal under ioniseringen (matrikseffekt). Dette påvirker dataene og kan gi betydelig feil ved kvantitative analyser. Matrikseffekter kan unngås ved å bruke LPME, fordi LPME gir svært rene ekstrakter fra kompliserte biologiske prøver [10].

Videre er 3-fase LPME særlig gunstig ettersom analyttene overføres til en vandig akseptorfase, som kan injiseres direkte i HPLC eller CE uten ytterligere tilberedningsprosedyrer. Ved 2-faseekstraksjoner overføres analyttene til en organisk fase som kan injiseres direkte i GC eller GC/MS [6].

Dessuten er det enklere å automatisere LPME-teknikken sammenlignet med LLE [6].

1.3 Målsetting

I tidligere publikasjoner har det blitt vist at LPME har et bredt anvendelsesområde for ekstraksjon av legemidler. Teknikken kan benyttes til ekstraksjon fra fullblod [4, 11], plasma [12, 13] og brystmelk [14]. Metoden kan brukes til prøveopparbeidelse av hydrofile eller hydrofobe basiske legemidler [15-17], og sure legemidler [18]. Ekstraktet av analytten ender enten i en vandig eller organisk løsning som kan injiseres direkte i CE, GC, GC/MS, HPLC eller LC/MS [19]. LPME er derfor en velegnet metode med bredt anvendelsesområde, både når det gjelder forskjellige typer analytter, prøvematriks og separasjonsteknikker. Til tross for alle fordelene LPME tilbyr i forhold til LLE, og den økende interessen for bruk av LPME som prøveopparbeidesteknikk, har det vært lite forskning på stabiliteten av SLM, der disse er i kontakt med luft eller vandig prøve. I tillegg har kun et begrenset utvalg av organiske løsemidler vært testet som SLM i LPME.

Målene for denne oppgaven har vært å generere kunnskap til optimalisering av LPME-teknikken med tanke på:

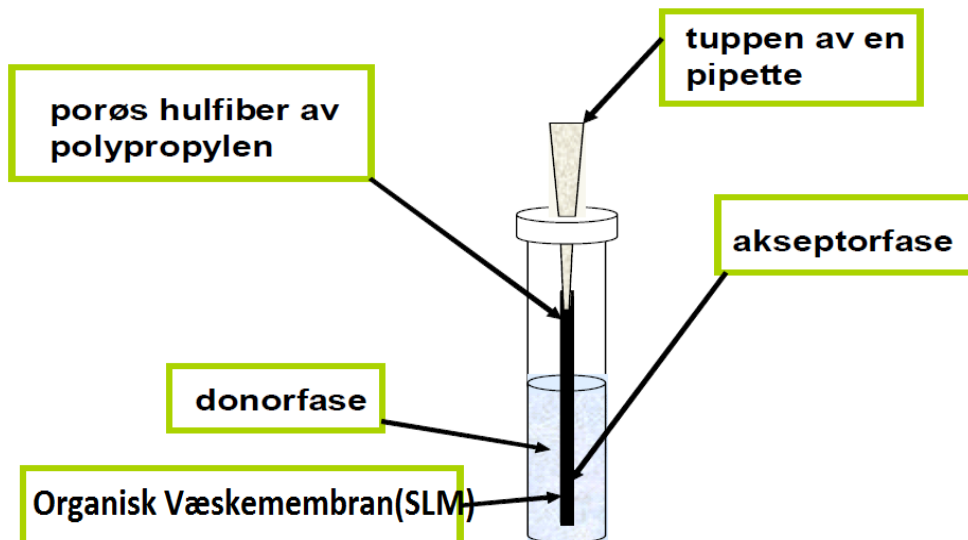
- Teste ulike løsemidlers stabilitet som SLM under eksponering i luft
- Teste ulike løsemidlers stabilitet som SLM under ekstraksjon
- Teste forskjellige metoder for å fjerne overskudd av SLM før ekstraksjon

- Teste en rekke nye løsemidler som SLM for ekstraksjon av sure og basiske legemidler

Slike grunnleggende anbefalinger kan være nyttige for analyselaboratorier ved fremtidige implementering og optimalisering av LPME. Samtidig kan de benyttes som hjelpemidler ved automatisering av metoden.

2 TEORI

2.1 Prinsipp for LPME



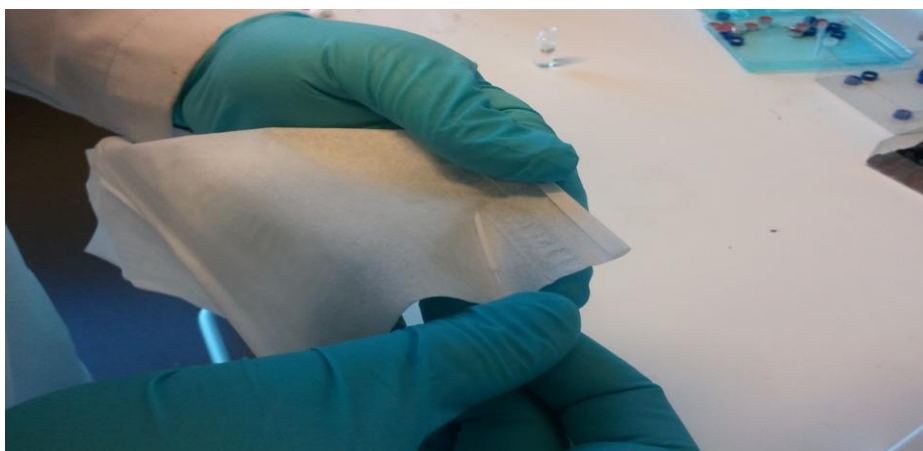
Figur 3. Prinsippskisse av LPME. Figuren er hentet fra [20]

Oppsettet av et LPME-system består av en vial med skrukork med silikonseptum som vist i figur 1. En porøs hulfiber festes til en pipettespiss i den ene enden og blir lukket med en tang i den andre enden. Lengden på hulfiberen varierer fra 1,5 til 8 cm [19]. Det lages et hull i silikonseptumet og pipettespissen som normalt er klippet til en bestemt lengde (1,5-3 cm), festes i septumhullet slik at hele hulfiberlengden kommer ned i vialen når korken skrus på. Hulfiberen impregneres i noen sekunder (se figur 4) med et organisk løsemiddel som ikke er blandbart med vann, slik at alle porene i polypropylenfiberen blir immobilisert av det organiske løsemiddelet. Det er kapillærkrefter som forårsaker immobiliseringen som finner sted når fiberen dyppes i det organiske løsemidlet. Ulempen med denne metoden er at man har ingen kontroll over mengden av organisk fase som blir sugd inn i hulfiberen, og dette kan variere fra gang til gang. Alternativet er å injisere et kjent volum av det organiske løsemidlet inn i lumen av hulfiberen, og immobilisere porene fra innsiden av fiberen [6].

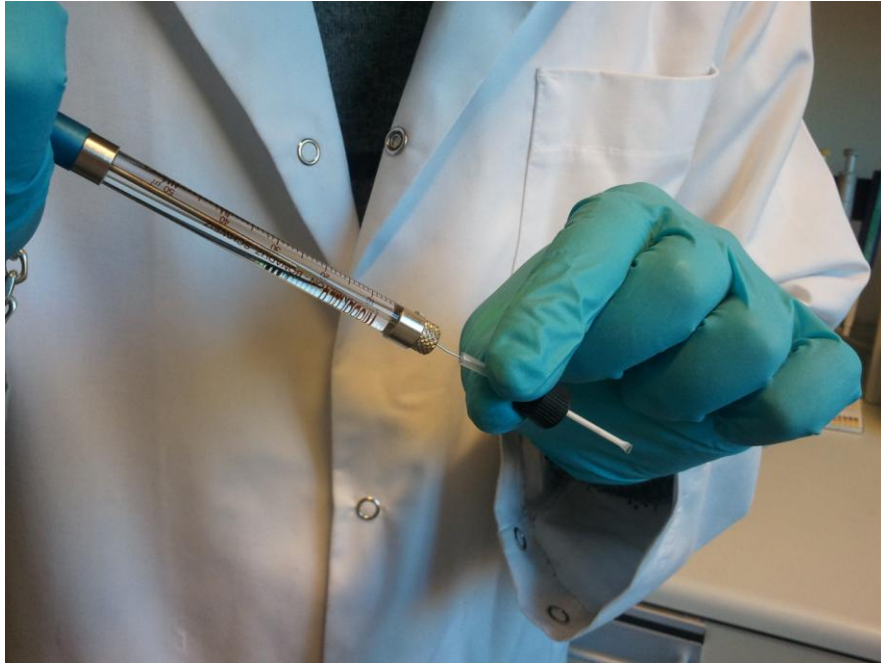
Prinsippet for LPME er slik at ønskede analytter ekstraheres fra en vandig prøve via en organisk fase og videre til en akseptorfase. For å få til en slik ekstraksjon fylles vialen med prøveløsningen, den porøse veggen til hulfiberen immobiliseres med organisk fase (figur 4), Overskudd av organisk fase fjernes med medisinsk tørkepapir (figur 5) og til slutt fylles lumen av hulfiberen med akseptorfase (figur 6). For å få en optimal effektivitet av ekstraksjonen, plasseres vialen på et risteapparat (vibrator) (se figur 7). Vibreringen gjør at analyttene kommer i bedre kontakt med væskemembranen. Ekstraksjonsutbyttet økes med ekstraksjonstid rundt 30-45 minutter og en hastighet på 104 Rad/s (\cong 1000 rpm) [19, 21]. Ekstraksjonen skjer når analyttene i prøveløsningen ekstraheres gjennom den organiske membranen, og videre til akseptorfasen i lumen av fiberen.



Figur 4. Immobilisering av organisk fase i hulfiber



Figur 5. Tørring av hulfiber med medisinsk tørkepapir rett etter immobilisering

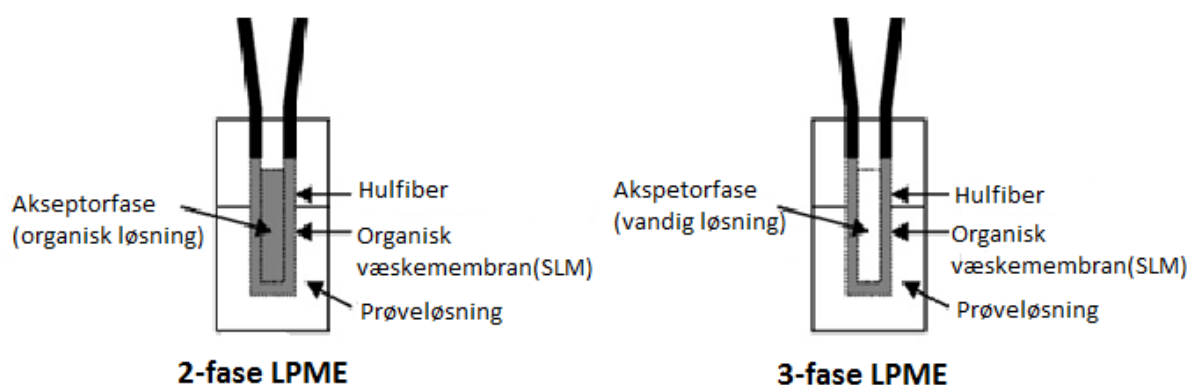


Figur 6. Akseptorløsningen fylles i lumen av hulfiberen med en mikrosprøyte



Figur 7. For å få en optimal effektivitet av ekstraksjonen, plasseres vialen på et risteapparat (vibrator)

LPME kan utføres som både to- og trefaseekstraksjon. Ved 2-faseekstraksjon, fylles både lumen og porene av fiberen med samme organiske løsemiddel. Analyttene ekstraheres fra den vandige prøveløsningen, gjennom SLM og inn i det samme organiske løsemidlet inne i fiberens hulrom. Akseptorfasen kan brukes videre til analyse i GC eller GC/MS. I 3-faseekstraksjon fylles lumen av hulfiberen med en vandig akseptorfase i stedet for organisk fase. Denne vandige akseptorfasen benyttes videre til analyse i HPLC eller CE [2, 6]. Illustrasjon av 2-fase og 3-fase LPME er presentert i figur 8.



Figur 8. Illustrasjon av 2-fase og 3-fase LPME. Figuren er hentet fra [6]

Mengde analytt som ekstraheres ved LPME bestemmes av fordelingskoeffisienten mellom den vandige fasen og den organiske fasen. Prosessen er en likevektsreaksjon, det vil si at konsentrasjonen av analytt i akseptorfasen vil øke helt til det oppnås likevekt [6, 22]. Etter at likevekten er oppnådd, vil analyttene (A) tilslutt være fordelt i de tre fasene slik som er illustrert i følgende likevektslikning [1].

$$A_{\text{donorfase}} \leftrightarrow A_{\text{organiskfase}} \leftrightarrow A_{\text{akseptorfase}} \quad (1)$$

Analyttens fordelingskoeffisienter mellom de tre fasene beregnes etter følgende likninger [1]:

$$K_{\text{org-don}} = \frac{c_{\text{eq,org}}}{c_{\text{eq,don}}} \quad (2)$$

$$K_{aks-org} = \frac{C_{eq,aks}}{C_{eq,org}} \quad (3)$$

$$K_{aks-don} = \frac{C_{eq,aks}}{C_{eq,don}} = K_{org-don} \times K_{aks-org} \quad (4)$$

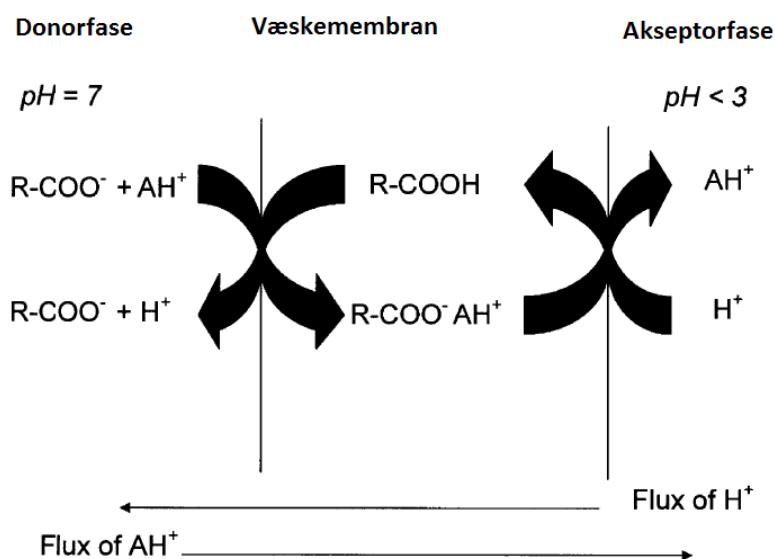
$C_{eq,org}$, $C_{eq,don}$, $C_{eq,aks}$ er henholdsvis analyttenes konsentrasjon ved likevekt i organisk fase, donorfase og akseptorfase.

Fordelingskoeffisientene mellom prøven og organisk fase ($k_{org-don}$), og mellom organisk fase og akseptorløsning ($k_{aks-org}$) må være stor nok til å få en tilfredsstillende ekstraksjon og høy oppkonsentreringsfaktor. En høy verdi av $k_{org-don}$ gir en høy grad av diffusjon av analyttene fra prøven til organisk membran, mens en høy verdi av $k_{aks-org}$ gjør at analyttene ekstraheres videre fra organisk membran til akseptorfase.

For at analyttene skal kunne diffundere effektivt fra donorfase til organisk membran, må pH i prøven justeres, slik at analyttene er på nøytral form. På denne måten vil analyttene være på uladet form og har dårligere løselighet i den vandige prøveløsningen, og vil derfor ekstraheres lett over i den organiske membranen (SLM). For at analyttene skal kunne diffundere lett fra organisk membran til akseptorfase, må pH i akseptorfase justeres slik at analyttene er i ionisert form. Ioniseringen i akseptorfase gjør at analyttene blir mer vannløselige og mindre løselige i organisk fase. For basiske forbindelser bør pH i prøveløsningen helst være 3 enheter høyere enn analyttens pKa-verdi, og akseptorfase bør ha pH ca. 3 enheter lavere enn pKa-verdien. Tilstanden er omvendt for sure stoffer [23]. Ekstraksjonen kan i tillegg bli påvirket av flere andre parametre, som blant annet volum av prøveløsning, volum av akseptor, type organisk løsemiddel, ekstraksjonstid, omrøringshastighet og tilsats av ulike salter [21, 24].

Som nevnt ovenfor drives 3-fase LPME basert på passiv diffusjon av analyttene med høye fordelingskoeffisienter. For svært hydrofile stoffer ($\log P < 1$) som har lave fordelingskoeffisienter, vil ikke ekstraheres i noen særlig grad ved passiv diffusjon. Løseligheten for disse stoffene er størst i vandig miljø i forhold til organisk fase. Fordelingen vil derfor være forskjøvet mot venstre (donorfase) i likning (1), og ekstraksjonen kan ikke lenger drives av fordelingskoeffisienten. Disse analyttene kan likevel ekstraheres ved hjelp av aktiv transport [16]. I dette konseptet tilsettes bæremolekyler (carrier) i donorfase.

Bæremolekylene danner hydrofobe ionepar med analyttene som til sammen er nøytral og mye mer hydrofob enn ionene er hver for seg i utgangspunktet. Dette gjør at analyttene blir mer løselige i organisk fase, noe som skyver likevekten i likningen (1) mot høyre. Figur 9 presenterer prinsippet for ekstraksjon av basiske stoffer ved hjelp av bæremolekyler.



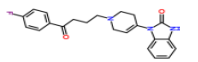
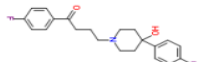
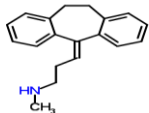
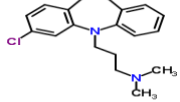
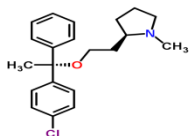
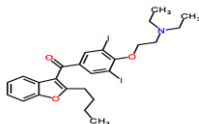
Figur 9. Prinsippskisse for carrier-mediert ekstraksjon [19]

Ioneparkompleksene ekstraheres fra donorfasen inn i den organiske fasen. Analyttene frigjøres i ionisert form fra organiskfasen når de møter akseptorfasen mens protoner fra akseptorfasen danner nye ionepar med bæremolekylene. Disse protonerte bæremolekylene frigjør protonene i prøveløsningen og gjentar deretter syklusen. pH justeres i de to vandige fasene slik at analyttene og bæremolekylene er i ionisert form i donorfasen mens kun analyttene er ionisert i akseptorfasen.

3 Eksperimentelt

3.1 Karakteristisk av analyserte substanser

Tabell 1. Kjemisk strukturer, fordelingskoeffisienter ($\log P$) og dissosiasjonskonstanter (pK_a) for basiske legemidler brukt i oppgaven

Struktur	Navn	pK_a	$\log P$	Leverandør
	Droperidol	8,23	3,1	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA
	Haloperidol	8	3,75	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA
	Nortriptylin	10	3,97	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA
	Klomipramin	9,46	4,84	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA
	Klemastin	10,23	5,3	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA
	Amiodaron	9,37	7,81	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA

Opplysninger er hentet fra SciFinder

Strukturene er hentet fra: <http://www.chemspider.com/>

Tabell 2. Kjemisk strukturer, fordelingskoeffisienter (log P) og dissosiasjonskonstanter (pKa) for sure legemidler brukt i oppgaven

Struktur	Navn	pKa	Log P	Leverandør
	Fenoprofen	4,2	3,72	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA
	Ibuprofen	4,41	3,5	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA
	Naproxen	4,84	2,88	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA
	Ketoprofen	4,23	2,91	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA
	Gemfibrozil	4,75	4,3	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA

Opplysninger er hentet fra Scifinder

Strukturene er hentet fra: <http://www.chemspider.com/>

3.2 Karakteristisk av kjemikalier

Tabell 3. Kjemikalier anvendt i oppgaven (forts. neste sider):

<i>Kjemikalier</i>	<i>Kvalitet</i>	<i>Leverandør</i>
<i>1-Oktanol</i>	<i>99 % (GC)</i>	<i>Sigma – Aldrich, St.Louis, MO, USA</i>
<i>1-Nonanol</i>	<i>98 %</i>	<i>Sigma – Aldrich, St.Louis, MO, USA</i>
<i>1-Dekanol</i>	<i>99 %</i>	<i>Sigma – Aldrich, St.Louis, MO, USA</i>
<i>Dodecylacetat</i>	<i>97 %</i>	<i>Sigma – Aldrich, St.Louis, MO, USA</i>
<i>Diheksyleter</i>	<i>97 %</i>	<i>Sigma – Aldrich, St.Louis, MO, USA</i>
<i>2-Oktanon</i>	<i>> 97 %</i>	<i>Fluka Chemie AG, Buchs, Sveits</i>
<i>2-Nonanon</i>	<i>Ikke angitt</i>	<i>Sigma – Aldrich, St.Louis, MO, USA</i>
<i>2-Nitofenyloktyleter</i>	<i>≥ 99 % (GC)</i>	<i>Fluka Chemie AG, Buchs, Sveits</i>
<i>Fenetol</i>	<i>≥ 99 % (GC)</i>	<i>Fluka Chemie AG, Buchs, Sveits</i>
<i>Eugenol</i>	<i>Ikke angitt</i>	<i>Fluka Chemie AG, Buchs, Sveits</i>
<i>Dodekan</i>	<i>≥ 99 %</i>	<i>Sigma – Aldrich, St.Louis, MO, USA</i>

<i>Neopentylbensen</i>	$\geq 97 \%$	<i>Sigma – Aldrich, St.Louis, MO, USA</i>
<i>Isopentylbensen</i>	<i>97 %</i>	<i>Sigma – Aldrich, St.Louis, MO, USA</i>
<i>Dibutylftalat</i>	<i>99 %</i>	<i>Sigma – Aldrich, St.Louis, MO, USA</i>
<i>3-Nitrostyren</i>	<i>96 %</i>	<i>Sigma – Aldrich, St.Louis, MO, USA</i>
<i>2-Oktyl-1-dodekanol</i>	<i>97 %</i>	<i>Sigma – Aldrich, St.Louis, MO, USA</i>
<i>2-Heksyl-1-dekanol</i>	<i>97 %</i>	<i>Sigma – Aldrich, St.Louis, MO, USA</i>
<i>1-Kloropentan</i>	<i>99 % (GC)</i>	<i>Fluka Chemie AG, Buchs, Sveits</i>
<i>Toluen</i>	<i>99,8 %</i>	<i>Sigma – Aldrich, St.Louis, MO, USA</i>
<i>Eddiksyre(glacial)</i>	<i>100 %</i>	<i>Merk K GaA, Darmstadt, Tyskland</i>
<i>Maursyre</i>	<i>98-100 %</i>	<i>Merk K GaA, Darmstadt, Tyskland</i>
<i>Natriumacetat</i>	$\geq 99 \%$	<i>Sigma – Aldrich, St.Louis, MO, USA</i>
<i>Pentan</i>	<i>99 % (GC)</i>	<i>Sigma – Aldrich, St.Louis, MO, USA</i>
<i>Sykloheksan</i>	$\geq 99,8 \%$	<i>Sigma – Aldrich, St.Louis, MO, USA</i>
<i>Hydroklorid</i>	<i>37 %</i>	<i>Merk K GaA, Darmstadt, Tyskland</i>

<i>Natriumhydroksid</i>	<i>98 %</i>	<i>VWR, Chemi-Teknikk AS, Oslo, Norge</i>
<i>Metanol</i>	<i>≥ 99,8 %</i>	<i>VWR, International AS, Oslo, Norge</i>
<i>Natriumhydrogenfosfat</i>	<i>~ 99 %</i>	<i>Sigma – Aldrich, St.Louis, MO, USA</i>
<i>Natriumdodecylsulfat(SDS)</i>	<i>≥ 98,5 %</i>	<i>Sigma – Aldrich, St.Louis, MO, USA</i>
<i>Betasyklodeksterin(β-CD)</i>	<i>Ikke angitt</i>	<i>Beckmann, Fullerton, USA</i>
<i>Borsyre</i>	<i>99,8 %</i>	<i>Merk K GaA, Darmstadt, Tyskland</i>
<i>Natriumborat (Borax)</i>	<i>Ikke angitt</i>	<i>Merk K GaA, Darmstadt, Tyskland</i>

3.3 Instrumenter og betingelser

3.3.1 LPME

Ekstraksjonen ble utført i 2 ml prøveglass (modell 2-SV) med skrukork og silikonseptum (modell 8-SC-ST15) fra Chromacol (Welwyn Garden City, UK). Pipettespissen som ble innført i silikonseptumet var en Finntip 200 Ext pipettespiss fra ThermoLabsystems (Helsingfors, Finland). Pipettespissen ble festet til polypropylen hulfiber av type Q3/2 (Membrana, Wuppertal, Tyskland). Hulfiberens indre diameter var 1.2 mm, veggene var 200 µm tykke og porestørrelsen var 0,2 µm. Ekstraksjonstiden var 45 minutter under vibrering med hastighet 1200 rpm, og ble utført på vibratoren Vibramax (Heidolph, Kelheim, Tyskland). Betingelsene er presentert i tabell 4

Tabell 4 Betingelser ved hulfiber-LPME:

<i>Parameter</i>	<i>Betingelse</i>
<i>Akseptorfase</i>	<i>25 μl</i>
<i>Donorfase</i>	<i>1 ml</i>
<i>Prøveglass</i>	<i>2 ml vial med skrukork</i>
<i>Ekstraksjonstid</i>	<i>45 min</i>
<i>Hastighet</i>	<i>1200 rpm</i>
<i>Lengde på hulfiber</i>	<i>2,6 cm</i>
<i>Immobiliseringstid</i>	<i>5 sekunder</i>
<i>Fiberbehandlig etter immobilisering</i>	<i>medisinsk tørkepapir</i>
<i>Mikrosprøyte</i>	<i>50 μl (Hamilton, Bonaduz, Sveits)</i>

3.3.2 GC/MS

LPME-Ekstraksjoner uten legemidler ble utført, og mengde lekkasje av SLM i både akseptor og donorfase ble analysert på et GC/MS-instrument, Shimadzu-QP2010 (Kyoto, Japan). Betingelsene er presentert i tabell 5.

Tabell 5. Betingelser ved analyse på GC/MS (forts. neste side)

<i>Parameter</i>	<i>Betingelse</i>
<i>Separasjonsskolonne</i>	<i>Kapillær: fused silika, VF-1 ms, 30m x 0,25 mm i.d., DF = 0,25 µm, FactorFour (Varian, Middelburg, Nederland)</i>
<i>Injeksjon</i>	<i>Split (1:100), 1 µl</i>
<i>Injektortemperatur</i>	<i>250 °C</i>
<i>Kolonnetemperatur</i>	<i>Kolonneovnen ble ved injeksjon holdt ved 40 °C i 1 min, så stigende til 180 °C med en hastighet på 40 °C/min, deretter stigende til 225 °C med en hastighet på 15 °C /min, videre stigende til 280 °C med en hastighet på 40 °C /min og til slutt holdt konstant på 280 °C for 2,5 min.</i>
<i>Separasjonstid</i>	<i>10 min</i>
<i>Bæregass</i>	<i>Helium (99.9990 %; AGA, Oslo, Norway)</i>
<i>Flowkontroll</i>	<i>Konstant trykk 64,8 kPa</i>
<i>MS</i>	<i>70 eV i elektronionisasjonsmodus</i>

<i>Interface temperature</i>	<i>250 °C</i>
<i>Ionekilde temperature</i>	<i>220 °C</i>
<i>Monitorering</i>	<i>SIM</i>

I denne oppgaven er det valgt å bruke SIM-metode for å fjerne uønskede massekromatogrammer. På den måten får man innstille massespektrometeret til å måle kun bestemte masser, nemlig massene til analytten av interesse, gjennom hele perioden hvor separasjonen foregår. Massene som ble brukt i denne oppgaven er hentet fra SciFinder, og presenteres i tabell 6. Ingen litteraturdata ble funnet for 2-oktyl-1-dodekanol, og derfor ble det kjørt fullscan (m/z 40-200) for dette løsemiddelet. Blanke prøver ble kjørt etter hver 3. analyse med fullscan metoden (m/z 40-200).

Tabell 6. masser(m/z) fra litteratur ved bruk av SIM-metoden i GC/MS (forts. neste side)

<i>Organisk fase (SLM)</i>	<i>Masse(r)(m/z) brukt ved SIM</i>
<i>Diheksyleter</i>	<i>43, 56, 85</i>
<i>NPOE</i>	<i>83, 112, 123, 139</i>
<i>1-Oktanol</i>	<i>41, 56, 70, 84</i>
<i>1-Nonanol</i>	<i>51, 70, 83, 98</i>
<i>1-Dekanol</i>	<i>83, 97, 112, 140</i>

<i>2-Nonanon</i>	<i>43, 58, 71</i>
<i>2-Oktanon</i>	<i>68, 128</i>
<i>Eugenol</i>	<i>131, 149, 164</i>
<i>Dodecylacetat</i>	<i>83, 97, 111, 125, 140, 168</i>
<i>Isopentylbensen</i>	<i>92, 105</i>
<i>Neopentylbensen</i>	<i>92, 133, 148</i>
<i>2-Heksyl-1-dekanol</i>	<i>83, 98, 111, 125, 139</i>
<i>2-Oktyl-1-dodekanol</i>	<i>Fullscan (m/z 40-200)</i>
<i>Dodekan</i>	<i>43, 57, 71, 85</i>
<i>Fenetol</i>	<i>66, 77, 94</i>
<i>Dibutylftalat</i>	<i>149, 205, 223</i>

3.3.3 HPLC

Ekstrakter av basiske substanser ble analysert på et HPLC-instrument, Agilent Technologies, 1200 serie (Matrix, Oslo, Norge). Betingelsene er presentert i tabell 7.

Tabell 7. Betingelser ved analyse på HPLC (forts. neste side)

<i>Parameter</i>	<i>Betingelse</i>
<i>Separasjonskolonne</i>	<i>Gemini (Phenomenex, Torrance, CA, USA), C18, 150 x 2,00 mm, partikkelstørrelse 5 µm</i>
<i>Flow</i>	<i>0,3 ml/min</i>
<i>Injeksjonsvolum</i>	<i>20 µl</i>
<i>Deteksjon</i>	<i>UV, 214 nm</i>
<i>Mobilfase</i>	<i>A) 95:5 (v/v) maursyre (20 mM)/metanol B) 95:5 (v/v) metanol/maursyre (20 mM)</i>
<i>Analysetid</i>	<i>17 min</i>
<i>Oppstartsprosedyre</i>	<i>Spyling med 95:5 Vann/ACN i 10 min Spyling med 95:5 ACN/vann i 10 min Spyling med 95:5 Vann/ACN i 5 min Spyling med mobilfaser 90:10 A/B til at konstant trykk oppnås</i>
<i>Separasjonsmetode</i>	<i><u>Gradient</u> etter injeksjon av prøven. Start med 90 % mobilfase A og 10 % mobilfase B. Øke</i>

	<i>elueringssstyrke gradvis inntil 40 % mobilfase A / 60 % mobilfase B innen 11 minutter, og denne sammensetningen ble holdt i 1 minutt. Deretter tilbake til startposisjon 90:10 A/B som holdes i 5 minutter før neste injeksjon.</i>
<i>Avslutningsprosedyre</i>	<i>Slå av UV-lampen.</i> <i>Spyling med 5 % ACN/vann i 5 min.</i> <i>Spyling med 95 % ACN/vann i 5 min.</i> <i>Spyling med 5 % ACN/vann i 5 min.</i>

3.3.4 CE

Ekstrakter av de sure stoffene ble analysert på et CE-instrument, MDQ (Beckmann, Fullerton, CA, USA). Alle betingelser ved CE er oppført i tabell 8.

Tabell 8 Betingelser ved analyse på CE(forts. neste side):

<i>Parameter</i>	<i>Betingelse</i>
<i>Kapillær</i>	<i>Fused silika, i.d. 75 µm, lengde 50 cm (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA)</i>
<i>Deteksjon</i>	<i>UV, 200 nm</i>
<i>Spenning</i>	<i>30.0 kV</i>

<i>Injeksjon</i>	<i>0,5 psi, 5 sekunder</i>
<i>Separasjonsbuffer</i>	<i>100 mM acetatbuffer, pH = 4,4</i>
<i>Separasjonstemperatur</i>	<i>25 °C</i>
<i>Prøvelagringstemperatur</i>	<i>5 °C</i>
<i>Oppstartsprosedyre ved nytt kapillær</i>	<i>Spyling med vann i 5 min. Trykk 20 psi</i> <i>Spyling med 10 mM NaOH i 30 min. Trykk 20 psi</i> <i>Spyling med separasjonsbuffer i 30 min. Trykk 20 psi</i>
<i>Oppstartsprosedyre daglig</i>	<i>Spyling med vann i 5 min. Trykk 20 psi</i> <i>Spyling med 10 mM NaOH i 10 min. Trykk 20 psi</i> <i>Spyling med separasjonsbuffer i 15 min. Trykk 20 psi</i>
<i>Prosedyre mellom hver analyse</i>	<i>Spyling med separasjonsbuffer i 2 min. Trykk 20 psi</i>
<i>Analysetid</i>	<i>10 min</i>
<i>Avslutningsprosedyre</i>	<i>Spyling med 10 mM NaOH i 5 min. Trykk 20 psi</i> <i>Spyling med vann i 2 min. Trykk 20 psi</i> <i>Spyling med luft i 2 min. Trykk 20 psi</i> <i>Slå av UV-lampen</i>

3.4 Tillaging av løsninger

3.4.1 Stamlløsninger

3.4.1.1 Stamlløsning for basiske stoffer

Stamlløsningen var en blanding av 6 basiske stoffer som bestod av renstoff av nortriptylin, haloperidol, droperidol, klomipramin, klemastin og amiodaron løst i metanol til 1 mg/ml. Løsningen ble oppbevart i kjølskap (2-8 °C) og beskyttet mot lys.

3.4.1.2 Stamlløsning for sure stoffer

Stamlløsningen var en blanding av 5 sure stoffer som bestod av renstoff av ibuprofen, ketoprofen, naproxen, fenoprofen og gemfibrozil løst i metanol til 1 mg/ml. Løsningen ble oppbevart i kjølskap (2-8 °C) og beskyttet mot lys.

3.4.1.3 Organiske faser i pentan

1,7 mg/ml diheksyleter i pentan: Det ble veid ut 17 mg DHE og løst opp i 10 ml pentan

1,94 mg/ml 1-oktanol i pentan: Det ble veid ut 19,4 mg 1-oktanol og løst opp i 10 ml pentan.

5,6 mg/ml 2-nitrofenyloktyleter i pentan: Det ble veid ut 28 mg NPOE og løst opp i 5 ml pentan

3.4.1.4 Organiske faser i sykloheksan

5,1 mg/ml 2-nitrofenyloktyleter i sykloheksan: Det ble veid ut 25,5 mg NPOE og løst opp i 5 ml sykloheksan.

4,4 mg/ml 2-oktanon i sykloheksan: Det ble veid ut 22 mg 2-oktanon og løst opp i 5 ml sykloheksan.

5,16 mg/ml eugenol i sykloheksan: Det ble veid ut 25,8 mg eugenol og løst opp i 5 ml sykloheksan.

5,84 mg/ml 1-nonanol i sykloheksan: Det ble veid ut 29,2 mg 1-nonanol og løst opp i 5 ml sykloheksan.

6,2 mg/ml 1-dekanol i sykloheksan: Det ble veid ut 31 mg 1-dekanol og løst opp i 5 ml sykloheksan.

5,9 mg/ml dodecylacetat i sykloheksan: Det ble veid ut 29,5 mg dodecylacetat og løst opp i 5 ml sykloheksan.

5,3 mg/ml 1-kloropentan i sykloheksan: Det ble veid ut 26,5 mg 1-kloropentan og løst opp i 5 ml sykloheksan.

6,2 mg/ml 2-nonanon i sykloheksan: Det ble veid ut 31 mg 2-nonanon og løst opp i 5 ml sykloheksan.

5,86 mg/ml 2-oktyl-1-dodekanol i sykloheksan: Det ble veid ut 29,3 mg 2-oktyl-1-dodekanol og løst opp i 5 ml sykloheksan.

4 mg/ml 2-heksyl-1-dekanol i sykloheksan: Det ble veid ut 40 mg 2-heksyl-1-dekanol og løst opp i 5 ml sykloheksan.

5,7 mg/ml fenetol i sykloheksan: Det ble veid ut 57 mg fenetol og løst opp i 10 ml sykloheksan.

5,5 mg/ml isopentylbensen i sykloheksan: Det ble veid ut 55 mg isopentylbensen og løst opp i 10 ml sykloheksan.

4,95 mg/ml neopentylbensen i sykloheksan: Det ble veid ut 49,5 mg neopentylbensen og løst opp i 10 ml sykloheksan.

4,86 mg/ml dodekan i sykloheksan: Det ble veid ut 48,6 mg dodekan og løst opp i 10 ml sykloheksan.

6 mg/ml dibutylftalat i sykloheksan: Det ble veid ut 60 mg dibutylftalat og løst opp i 10 ml sykloheksan

3.4.2 Standardløsninger

3.4.2.1 10 µg/ml standardløsning av basiske stoffer

Standardløsningene for de 6 basiske stoffene ble laget ved å pipettere ut 100 µl av stamløsningen (1 mg/ml) og fortynnet til 10 ml med 10 mM HCl.

3.4.2.2 20 µg/ml standardløsning av sure stoffer

Standardløsningene for de 5 sure stoffene ble laget ved å pipettere ut 200 µl av stamløsningen (1 mg/ml) og fortynnet til 10 ml med 10 mM HCl.

3.4.2.3 Standardløsninger for organiske faser i pentan

5,1 µg/ml diheksyleter i pentan: Standardløsningen ble laget ved å pipettere ut 1 ml av stamløsningen (1,7 mg/ml) og fortynne denne til 10 ml med pentan (= 170 µg/ml). 300 µl av denne løsningen ble ytterligere fortynnet til 10 ml med pentan.

3,88 µg/ml 1-oktanol i pentan: Standardløsningen ble laget ved å pipettere ut 20 µl av stamløsningen (1,94 mg/ml) og fortynne denne til 10 ml med pentan.

112 µg/ml 2-nitrofenyl-oktyleter (NPOE) i pentan: Standardløsningen ble laget ved å pipettere ut 200 µl av stamløsningen (5,6 mg/ml) og fortynne denne til 10 ml med pentan.

3.4.2.4 Standardløsninger for organiske faser i sykloheksan

102 µg/ml 2-nitrofenyloktyleter i sykloheksan: Standardløsningen ble laget ved å pipettere ut 200 µl av stamløsningen (5,1 mg/ml) og fortynne denne til 10 ml med sykloheksan.

88 µg/ml 2-oktanon i sykloheksan: Standardløsningen ble laget ved å pipettere ut 200 µl av stamløsningen (4,4 mg/ml) og fortynne denne til 10 ml med sykloheksan.

103,2 µg/ml eugenol i sykloheksan: Standardløsningen ble laget ved å pipettere ut 200 µl av stamløsningen (5,16 mg/ml) og fortynne denne til 10 ml med sykloheksan.

116,8 µg/ml 1-nonanol i sykloheksan: Standardløsningen ble laget ved å pipettere ut 200 µl av stamløsningen (5,84 mg/ml) og fortynne denne til 10 ml med sykloheksan.

124 µg/ml 1-dekanol i sykloheksan: Standardløsningen ble laget ved å pipettere ut 200 µl av stamløsningen (6,2 mg/ml) og fortynne denne til 10 ml med sykloheksan.

118 µg/ml dodecylacetat i sykloheksan: Standardløsningen ble laget ved å pipettere ut 200 µl av stamløsningen (5,9 mg/ml) og fortynne denne til 10 ml med sykloheksan.

106 µg/ml 1-kloropentan i sykloheksan: Standardløsningen ble laget ved å pipettere ut 200 µl av stamløsningen (5,3 mg/ml) og fortynne denne til 10 ml med sykloheksan.

124 µg/ml 2-nonanon i sykloheksan: Standardløsningen ble laget ved å pipettere ut 200 µl av stamløsningen (6,2 mg/ml) og fortynne denne til 10 ml med sykloheksan.

117,2 µg/ml 2-oktyl-1-dodekanol i sykloheksan: Standardløsningen ble laget ved å pipettere ut 200 µl stamløsningen (5,86 mg/ml) og fortynne denne til 10 ml med sykloheksan.

80 µg/ml 2-heksyl-1-dekanol i sykloheksan: Standardløsningen ble laget ved å pipettere ut 200 µl stamløsningen (4 mg/ml) og fortynne denne til 10 ml med sykloheksan.

114 µg/ml fenetol i sykloheksan: Standardløsningen ble laget ved å pipettere ut 200 µl stamløsningen (5,7 mg/ml) og fortynne denne til 10 ml med sykloheksan.

105 µg/ml isopentylbensen i sykloheksan: Standardløsningen ble laget ved å pipettere ut 200 µl stamløsningen (5,5 mg/ml) og fortynne denne til 10 ml med sykloheksan.

99 µg/ml neopentylbensen i sykloheksan: Standardløsningen ble laget ved å pipettere ut 200 µl stamløsningen (4,95 mg/ml) og fortynne denne til 10 ml med sykloheksan.

97,2 µg/ml dodekan i sykloheksan: Standardløsningen ble laget ved å pipettere ut 200 µl stamløsningen (4,86 mg/ml) og fortynne denne til 10 ml med sykloheksan.

120 µg/ml dibutylftalat i sykloheksan: Standardløsningen ble laget ved å pipettere ut 200 µl stamløsningen (6 mg/ml) og fortynne denne til 10 ml med sykloheksan.

3.4.3 Prøveløsninger

Prøveløsninger fortynnet med NaOH eller HCl ble laget ukentlig. Dette var på grunn av muligheten for degradering av legemidlene i basisk eller sur miljø. Løsningene ble oppbevart i kjølskap (2-8 °C) og beskyttet mot lys.

3.4.3.1 1 µg/ml prøveløsning av basiske stoffer i NaOH

Prøveløsningen ble laget ved å pipettere ut 100 µl av stamløsningen for basiske stoffer (1 mg/ml), og fortynne denne til 100 ml med 10 mM NaOH.

3.4.3.2 1 µg/ml prøveløsning av sure stoffer i HCl

Prøveløsningen ble laget ved å pipettere ut 100 µl av stamløsningen for sure stoffer (1 mg/ml), og fortynne denne til 100 ml med 10 mM HCl.

3.4.4 Akseptor og donor-faser

3.4.4.1 10 mM HCl, 250 ml

Løsningen ble laget ved å fortynne 2,07 ml HCl (37 %) til 25 ml med destillert vann. 2,5 ml av løsningen ble pipettert ut og fortynnet til 250 ml med destillert vann.

3.4.4.2 10 mM NaOH, 250 ml

Løsningen ble laget ved å veie ut 100 mg NaOH som ble løst opp i et totalvolum på 250 ml destillert vann.

3.4.5 Mobilfaser

0,377 ml konsentrert HCOOH i LC-MS kvalitet ble fortynnet til et totalvolum på 500 ml og en konsentrasjon på 20 mM. Mobilfase A inneholdt 475 ml 20 mM HCOOH og 25 ml metanol. Mobilfase B inneholdt 25 ml 20 mM HCOOH og 475 ml metanol.

3.4.6 Bufferløsninger

3.4.6.1 Acetatbuffer, 100 mM, pH = 4.4, 100 ml

Bufferløsningen ble laget ved å blande 30,5 ml 0,2 M eddiksyre og 19,5 ml 0,2 M natriumacetat, som ble fortynnet til 100 ml med destillert vann.

0,2 M eddiksyre ble laget ved å fortynne 1,15 ml konsentrert eddiksyre til 100 ml med destillert vann.

0,2 M natriumacetat ble laget ved å løse opp 1,64 g natriumacetat i destillert vann, som ble fortynnet til 100 ml.

3.4.6.2 Acetatbuffer, 100 mM, pH = 4.6, 100 ml

Bufferløsningen ble laget ved å blande 25,5 ml 0,2 M eddiksyre og 24,5 ml 0,2 M natriumacetat, og fortynnet til 100 ml med destillert vann.

0,2 M eddiksyre ble laget ved å fortynne 1,15 ml konsentrert eddiksyre til 100 ml med destillert vann.

0,2 M natriumacetat ble laget ved å løse opp 1,64 g natriumacetat i destillert vann og fortynnet til 100 ml.

3.4.6.3 Acetatbuffer, 100 mM, pH = 4.8, 100 ml

Bufferløsningen ble laget ved å blande 20 ml 0,2 M eddiksyre og 30 ml 0,2 M natriumacetat, og fortynnet til 100 ml med destillert vann.

0,2 M eddiksyre ble laget ved å fortynne 1,15 ml konsentrert eddiksyre til 100 ml med destillert vann.

0,2 M natriumacetat ble laget ved å løse opp 1,64 g natriumacetat i destillert vann og fortynnet til 100 ml.

3.4.6.4 Boratbuffer, 50mM, pH = 8,8

Bufferløsningen ble laget ved å blande 50 ml 0,2 M borsyre med 30 ml 0,05 M natriumborat (borax) som ble fortynnet til 200 ml med destillert vann.

0,2 M borsyre ble laget ved å løse opp 1,24 g borsyre i destillert vann og fortynnet til 100 ml.

0,05 M natriumborat ble laget ved å løse opp 1,905 g natriumborat i destillert vann og fortynnet til 100 ml.

3.4.6.5 Natriumboratbuffer, 50 mM, pH = 8,5

Bufferløsningen ble laget ved å løse opp 1,905 g natriumborat i destillert vann og fortynnet til 100 ml. pH i løsningen ble justert ned fra 9,4 til 8,5 ved dråpevis titrering med 0,5 M HCl.

3.4.6.6 Fosfatbuffer med beta-syklodeksterin, pH = 9

Metoden for å lage bufferløsningen ble tatt fra Mardones et.al. 2001 [25]. Bufferløsningen ble laget ved å løse opp 35,6 mg Na_2HPO_4 i 10 ml destillert vann. Deretter justeres pH i løsningen ned til pH 9 med 0,1 M HCl. Til slutt løses opp 50 mM natriumdodecylsulfat (SDS) (som tilsvarer 144.2 mg), og 20 mM beta-syklodekstrin (tilsvarer 227 mg) i løsningen. Det ble brukt ultralydbad for å få løst opp hele stoffet i løsningen.

3.5 Prøveopparbeidelse

3.5.1 LPME-HPLC for beregning av utbytte på basiske legemidler

Prøveløsningen besto av 1 μg / ml av nortriptylin, haloperidol, droperidol, klomipramin, klemastin og amiodaron i 10 mM HCl. SLM ble utarbeidet ved å dyppe hulfiberen inn i organiske løsemidler av interesse i 5 sekunder, og overskudd av løsemiddel ble fjernet med medisinsk tørkepapir. Deretter ble 25 ml akseptorfase (10 mM HCl) injisert med en mikrosprøyte inn i lumen av den hulfiberen. Hulfiberen med SLM og akseptorfase ble plassert i prøveløsningen i et 2 ml glass med skrukork, og hele oppsettet ble vibrert på 1200 rpm i 45 minutter. Etter ekstraksjon ble 20 μl av akseptorfase hentet ut med en mikrosprøyte og fortynnet med 20 μl 10 mM HCl, og injisert i HPLC. Fortynningen med HCl gjøres for å skaffe nok mengde av prøveløsning, da injeksjonsvolumet av HPLC er stilt på 20 μl .

3.5.2 LPME-CE for beregning av utbytte på sure legemidler

Prøveløsningen besto av 1 μg / ml av ibuprofen, naproxen, ketoprofen, og gemfibrozil i 10 mM HCl. SLM ble utarbeidet ved å dyppe hulfiberen i organiske løsemiddel i 5 sekunder og overskudd av løsemiddel ble fjernet med medisinsk tørkepapir. Deretter ble 25 ml akseptorfase (10 mM NaOH) injisert med en mikrosprøyte inn i lumen av hulfiberen. Hulfiberen med SLM og akseptorfase, ble plassert i prøveløsningen i ett 2 ml glass med

skrukork, og hele oppsettet ble vibrert på 1200 rpm i 45 minutter. Etter ekstraksjon ble 20 µl av akseptorfasen hentet ut med en mikrosprøyte og injisert i CE.

3.5.3 LPME-GC/MS for beregning av lekkasje

1 ml av prøveløsningen (10 mM NaOH uten legemidler) ble plassert i et 2 ml glass med skrukork. Den porøse hulfiberen ble immobilisert med et organisk løsemiddel, og lumen av hulfiberen ble fylt med 25 µl av 10 mM HCl. Hulfiberen senkes til slutt ned i prøveløsningen og hele oppsettet ristes på 1200 rpm i 45 minutter. 100 µl av den legemiddelfrie prøven og akseptorfasen ble tatt ut og hver ekstrahert med 100 µl pentan eller sykloheksan i 15 minutter. For å beregne lekkasjen i akseptorfasen ble 20 µl av akseptorfasen tatt ut med en mikrosprøyte, og ekstrahert med 100 µl pentan/sykloheksan i 15 minutter. Ekstraktet ble tilslutt analysert ved GC/MS, og konsentrasjonen av løsemiddel (C_{akseptor}) ble beregnet basert på sammenligning med en standardløsning av løsemiddelet med kjent konsentrasjon i pentan/sykloheksan. Lekkasjen i donorfasen ble beregnet slik at 100 µl av donorfasen ble tatt ut. Denne ble ekstrahert med 100 µl pentan/sykloheksan i 15 minutter. Ekstraktet ble endelig analysert ved GC/MS, og konsentrasjonen av løsemiddel ($C_{\text{prøve}}$) ble beregnet basert på sammenligning med en standardløsning av løsemiddelet med kjent konsentrasjon i pentan/sykloheksan.

3.5.4 Veieforsøk for beregning av fordampning av organisk fase i luft

Et 26 mm langt stykke polypropylen hulfiber ble først veid på en analysevekt (Modell 200 AE, Mettler, Greifensee, Sveits) for å måle den nøyaktige vekten av den tørre fiberen (w_d). Deretter ble fiberen immobilisert med organisk løsemiddel, og tørket med medisinsk tørkepapir, og veid umiddelbart (W_i , $t = 0$). Videre forble fiberen på analysevekten i 60 minutter, og vekten ble målt etter 2, 5, 10, 30, og 60 minutter. På hvert tidspunkt, ble vekten registrert (w_i).

3.6 Beregninger

For å beregne utbytte eller % lekkasje i denne oppgaven, ble topparealene brukt som en indikasjon for konsentrasjon av legemiddelsubstansene.

3.6.1 Tap av SLM ved fordamping (%)

tapandelen (w/w) av SLM ble beregnet etter følgende ligning:

$$\% \text{ tap (w/w)} = \left(\frac{w_i - w_{i,t=0}}{w_{i,t=0} - w_d} \right) * 100 \%$$

Der w_d er vekten av den tørre fiberen, w_i er vekten av fiberen på hvert tidspunkt og $w_{i,t=0}$ er vekten av fiberen rett etter immobilisering og tørking.

3.6.2 Utbytte(%)

Ekstraksjonsutbytter ble beregnet etter følgende formel:

$$\text{Utbytte \%} = R = \left(\frac{n_a}{n_p} \right) * 100 \% = \left(\frac{V_a \cdot C_a}{V_p \cdot C_p} \right) * 100 \%$$

Der C_a er legemiddelets konsentrasjon i akseptorfase etter ekstraksjon og C_p er legemiddel konsentrasjon i prøveløsningen før ekstraksjon. V_a og V_p er volumene av henholdsvis akseptorfase og prøveløsning.

n_p er mengde legemiddel som var opprinnelig i prøven, og n_a er mengde av legemiddel som er ekstrahert over i akseptorfasen.

3.6.3 Lekkasje(%)

Tapandelen (w/w) av SLM etter LPME ble beregnet etter følgende ligning:

$$\% \text{ lekkasje (w/w)} = \left(\frac{V_s \cdot C_s + V_a \cdot C_a}{w_{i,t=0} - w_d} \right) * 100 \%$$

Der V_s og V_a er volumene av henholdsvis prøveløsning og akseptorfase. C_s og C_a er konsentrasjoner av henholdsvis prøveløsning og akseptor. w_d er vekten av den tørre fiberen før immobilisering og $w_{i,t=0}$ er vekten av fiberen rett etter immobilisering og tørking.

4 Resultater og diskusjon

4.1 Innledende forsøk

Riktig valg av organisk fase har stor betydning for graden av ekstraksjonsutbytte. Det er mange faktorer man må ta hensyn til for å oppnå høyt ekstraksjonsutbytte. Noen av disse parametrene som for eksempel analyttens fordelingskoeffisient mellom prøve og akseptor er nevnt tidligere i oppgaven (se 2.1 i Teori). Karakteristikk av den organiske fasen som benyttes under LPME er også en viktig parameter for å oppnå høyt utbytte. Den organiske fasen som velges må ha lav løselighet i vandig miljø samtidig som den må immobiliseres godt inn i hulfiberen. Dette er viktig på grunn av at lekkasjen av organisk fase minimaliseres fra hulfiberen til akseptor- og donorfasen. Samtidig er det viktig å tenke på løsemiddelets kokepunkt, da det er en fordel at løsemidler har et høyt kokepunkt for å forhindre fordamping i forkant av ekstraksjon og under ekstraksjon.

De innledende forsøkene i denne oppgaven gikk hovedsakelig ut på å forsøke å kartlegge ovennevnte faktorer. Mobilfaser, kjemikalier og metodene benyttet i analyseinstrumentene ble stort sett valgt ut fra erfaringer gjort i tidligere studier [18, 25]. Noen av metodene ble optimalisert i forhold til utvalgte analysesubstanser og betingelser for oppgaven.

Innledningsvis i dette arbeidet, var 19 forskjellige løsemidler valgt som SLM-kandidater. Fire av disse løsemidlene, nemlig 1-oktanol, diheksyleter, dodecylacetat, og 1-nonanol har blitt brukt ofte i tidligere LPME rapporter, og disse løsemidlene ble inkludert som eksempler på populære 3-fase LPME-løsemidler [8, 11, 12]. Fem av disse løsemidlene, nemlig 2-nitrofenyloktyleter, 1-dekanol, 2-oktanon, toluen, og 1-kloropentan, har vært brukt i noen få tilfeller i 3-fase LPME [8], mens de resterende 10 løsemidlene var helt nye i forbindelse med 3-fase LPME.

4.1.1 Stabilitetsforsøk av SLM når den er i kontakt med luft

I det første settet av eksperimenter ble de ulike løsemidlene testet med hensyn til flyktighet fra hulfiberen. Denne typen informasjon om stabilitet av SLM er særlig viktig ved valg av SLM for 3-fase LPME. Det ideelle løsemiddelet bør være ikke-flyktig. Dette fører til at tap av SLM under håndtering av hulfiberen før ekstraksjon blir minst mulig. Forsøket ble utført slik at hulfibrene ble immobiliserte med ulike løsemidler, og fordamping av løsemidler versus tid ble målt for hvert løsemiddel på en analysevekt. Resultatene fra dette forsøket er oppsummert i tabell 9. Vekttap av SLM som % (w/w) er målt henholdsvis 2, 5, 10, 30, og 60 minutter etter immobilisering. Løsemidlene ble arrangert i synkende rekkefølge etter stabilitet i tabell 9. Dodecylacetat ble funnet å være den mest stabile SLM med hensyn til fordamping. Tap av SLM for dette løsemidlet var ikke målbart med den analysevekten selv etter 60 minutters eksponering i luft ved romtemperatur. Andre løsemidler som 2-nitrofenyloktyleter, eugenol, 1-decanol, 1-nonanol, og diheksyleter ble også funnet å være svært stabile i hulfiberen med hensyn til fordamping.

Ut fra tabell 9 ser man at løsemidler med kokepunkt over cirka 225 °C ble funnet å være stabile. For disse stoffene var tap av SLM ved fordamping ikke målbart 5 minutter etter immobilisering. Dette er svært viktig for å opprettholde integriteten til SLM under håndtering av hulfiber før LPME. I praksis blir SLM forberedt kort tid før ekstraksjon, og dermed er alle løsemidlene akseptable med tanke på flyktighet, med unntak av toluen og 1-kloropentan. De to sistnevnte løsemidlene er svært flyktige, og er ikke anbefalte for 3-fase LPME. Toluen og 1-kloropentan ble derfor ekskludert fra resten av eksperimentene i dette arbeidet.

Tabell 9. Tap av løsemiddel fra hulfiber via fordamping i luft

		Vekttap x minutter etter immobilisering (%) ²				
	kokepunktdata fra litteratur (°C) ¹					
		x=2 min	x=5 min	x=10 min	x=30 min	x=60 min
Dodecylacetat	265	0	0	0	0	0
2-Nitrofenyloktyleter	351	0	0	0	0	0.6
Dibutylftalat	337	0	0	0	0.6	0.6
3-Nitrostyren	239	0	0	0	0	0.7
Eugenol	255	0	0	0.6	0.6	1.9
1-Dekanol	228	0	0	0.8	2.4	2.4
2-Heksyl-1-dekanol	304	0	0	0.8	1.6	2.5
1-Nonanol	212	0	0	0.8	3.2	3.2
2-Oktyl-1-dodekanol	358	0	0	0.8	3.2	4.7
Diheksyleter	223	0	0.8	1.6	4.0	5.6
1-Oktanol	195	0.8	1.6	2.5	5.8	7.5
Dodekan	216	0	0.9	2.7	6.3	10.8
2-Nonanon	194	0.8	2.5	4.2	11.9	21.2
Isopentylbensen	193	0.7	2.2	3.6	12.2	22.3
Neopentylbensen	209	1.6	4.7	9.4	27.3	53.1
2-Oktanon	173	1.6	4.8	9.6	28.8	53.6
Fenetol	170	2.1	5.0	9.9	30.5	59.6
Toluen	111	34.5	87.1	100	100	100
1-kloropentan	107	40.6	95.6	100	100	100

¹SciFinder, ²Målt på en analysevekt (se eksperimentelt avsnitt 3.5.4)

4.1.2 Lekkasje av SLM i akseptor- og donorfase

I neste sett av eksperimenter ble de 17 gjenværende løsemidlene testet med hensyn til oppløselighet i vandige faser på begge sider av SLM. Denne typen informasjon er viktig for valg av SLM for 3-fase LPME. De ideelle løsemidlene bør ha lav løselighet i vann for å unngå lekkasje og delvis tap av SLM under ekstraksjon. For alle 17 løsemidlene, ble løselighetsdata hentet fra litteraturen. Disse er oppsummert i tabell 10. Litteraturverdiene ble samlet inn både ved pH 2 og pH 10, verdier som inkluderer de ulike pH-betingelsene som benyttes ved 3-fase LPME. Disse løsemidlene ble arrangert i tabell 10 etter stigende vannløselighet. Gyldigheten av disse litteraturdataene med hensyn til 3-fase LPME ble undersøkt slik at % lekkasje (w/w) av de utvalgte løsemidlene ble målt ved LPME-GC/MS. (se eksperimentelt seksjonen 3.5.3). Lekkasjen ble målt i både prøveløsning og i akseptorløsning. Disse dataene er også illustrert i tabell 10. Resultatene viser at GC/MS-dataene var i samsvar med litteraturverdiene for løselighet, ved at litteraturverdiene ga en god indikasjon på løsemiddelets tendens til å lekke fra hulfiberen inn i akseptor- og donorfase. Fremtidige valg av løsemidler for 3-fase LPME kan dermed være basert på litteraturdata for vannløselighet av utvalgte løsemidler.

I tillegg viste GC-MS dataene generelt høyere nivåer av løsemiddellekkasje ut i prøveløsningen enn inn i akseptorløsningen. Dette var sannsynligvis på grunn av at større agitasjon ble indusert til prøveløsningen, mens akseptorfase var mer eller mindre stillestående fordi den ble holdt i ro av kapillærkrefter i lumen av hulfiberen. På grunn av disse stillestående forholdene i akseptorfaseløsningen, lekket mindre mengder av løsemiddel inn i akseptorfase sammenlignet med donorfase.

Ut i fra GC/MS-dataene, ble % tap (w/w) av SLM under LPME beregnet, og vist i tabell 10. For diheksyleter var for eksempel bare 0,1 % (w/w) av SLM funnet å lekke inn i de vandige fasene, og dermed ble cirka 99,9 % (w/w) av SLM igjen i hulfiberen etter 45 minutters LPME. Med andre ord ble diheksyleter som SLM funnet å være svært stabilt i hulfiberen. Høy stabilitet ble også funnet for dodecylacetat og 2-nitrofenyloktyleter ved hjelp av GC/MS. Interessant nok var 1-oktanol som har vært svært populært 3-fase LPME-løsemiddel, funnet å lekke betydelig, og ca 9,2 % (w/w) av denne SLM gikk tapt

under 45 minutters LPME. Denne verdien kan forventes å bli enda høyere hvis ekstraksjoner utføres fra et større volum av vandig prøve, eller hvis prøven inneholder matrikskomponenter som for eksempel surfaktanter. For mer pålitelige LPME-systemer i fremtiden bør dermed 1-oktanol fortrinnsvis erstattes av et annet organisk løsemiddel. For eugenol, ett av de mest vannløselige løsemidlene som ble testet, ble cirka 25,2 % (w/w) funnet å lekke fra SLM under LPME, og dette løsemiddelet ble derfor utelukket fra resten av denne studien.

Resultatene i tabell 10 viser at vannløselighetsdata fra litteraturen kan være en bra indikasjon for valg av SLM. Det kan tolkes slik at løsemidler med løselighet lavere enn cirka 100 µg/ml er gode SLM-kandidater. Disse forblir stabile i hulfiberen under ekstraksjon (mer enn 97 - 99 % av SLM er intakt etter ekstraksjon). Stabilitet av SLM under ekstraksjon er en viktig parameter for å få et robust ekstraksjonssystem. Høyere stabilitet og mindre lekkasje av SLM gjør at nivået av organiske løsemidler, særlig i akseptorfasen blir på spornivå, som er en fordel for den endelige analysen med kromatografi, elektroforese eller massespektrometri.

Tabell 10. Vannløselighet og % (w/w) tap av SLM gjennom LPME

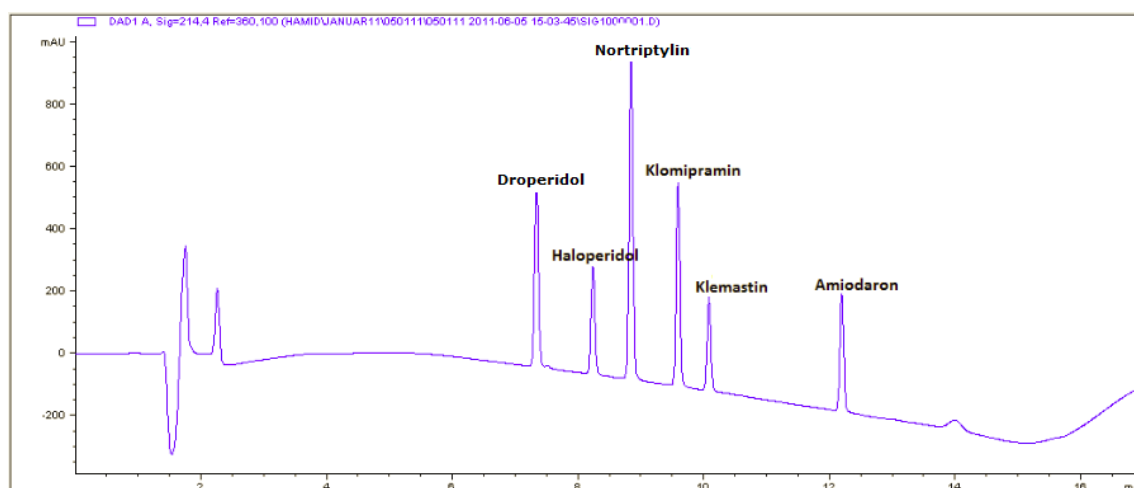
Løsemiddel	Løselighetsdata fra litteratur ¹		Konsenterasjon ²		% (w/w) tap under ekstraksjon ³
	(µg/ml)		(µg/ml)		
	pH = 2	pH = 10	Akseptor	Prøve	
2-Oktyl-1-dodekanol	4.2·10 ⁻⁵	4.2·10 ⁻⁵			
Dodekan	0.002	0.002	3	2	0.02
2-Heksyl-1-dekanol	0.039	0.039	0	14	0.1
Neopentylbensen	1.9	1.9	11	365	2.8
Isopentylbensen	2.5	2.5	5	75	0.5
2-Nitrofenyloktyleter	6	6	1	62	0.4
Dodecylacetat	20	20	3	23	0.2
Dibutylftalat	25	25	4	209	1.3
Diheksyleter	110	110	9	13	0.1
1-Dekanol	120	120	9	437	3.7
3-Nitrostyren	300	300			
1-Nonanol	390	390	109	703	6.0
2-Nonanon	1100	1100	274	335	2.9
1-Oktanol	1200	1200	859	1096	9.2
Fenetol	1500	1500	442	450	3.3
Eugenol	1800	2600	2900	3989	25.2
Oktanon	2300	2300	933	1100	9.2

¹Litteratordataene er hentet fra SciFinder

²Bregnet ut i fra topparealene i GC-MS, ³ Beregnet fra formelen i seksjon 3.6.3 i Eksperimentelt

4.1.3 Ekstraksjonsutbytte (%) av ulike SLM for basiske modellsustanser

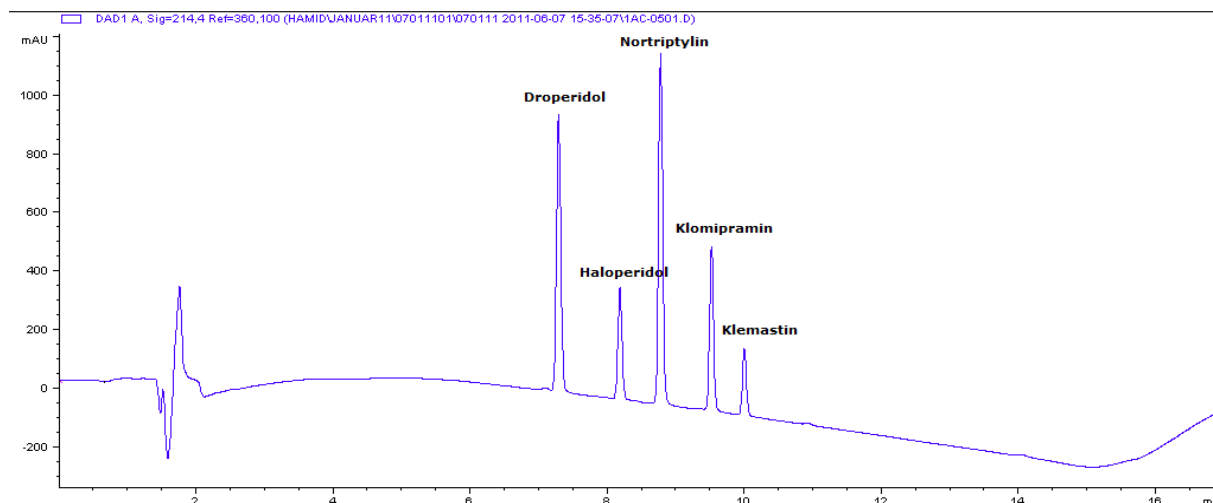
I den neste rekken eksperimenter, ble 16 løsemidler testet som SLM for ekstraksjon av utvalgte legemidler. Hensikten med dette var å karakterisere deres ekstraksjonsutbytte, siden de fleste av disse løsemidlene ikke har vært brukt tidligere for 3-fase LPME. Nortriptylin, haloperidol, droperidol, klomipramin, klemastin og amiodaron ble valgt som modellsustanser for dette eksperimentet. Strukturer, pKa og log P-verdier er oppsummert i tabell 1. I figur 10 presenteres kromatogrammet til standardløsningen for de 6 utvalgte modellsustansene. Kromatogrammet viser en fin separasjon av utvalgte stoffer. Rekkefølgen av sustansene ble funnet ved å kjøre standarder av de enkelte stoffene.



Figur 10. Kromatogrammet av 10 µg/ml standardløsning av basiske modellsustanser i HPLC

Som et eksempel presenteres kromatogrammet av utvalgte basiske modellsustanser ved bruk av 2-nonanon som SLM i figur 11. Som det observeres i figur 11, finnes bare 5 topper i kromatogrammet, toppen for amiodaron mangler. Heller ingen av de andre SLM-kandidatene klarte å ekstrahere amiodaron ved LPME. Grunnen til dette kan være høy lipofilisitet (log P = 7,2) av amiodaron. Som nevnt tidligere (se kapittel 2.1 i teori), må fordelingskoeffisienten mellom prøven og den organiske fasen ($k_{org-don}$) være stor nok til at analyttene ekstraheres fra vandig prøve til organisk fase. Videre må fordelingskoeffisienten mellom akseptor- og den organiske fasen ($k_{aks-org}$) være stor nok til at analyttene ekstraheres videre fra hulfiberen til den vandige akseptorfase. I dette

tilfellet ekstraheres amiodaron godt fra prøveløsningen til den organiske væskemembranen, men det blir ingen tilbakeekstraksjon fra hulfiberen til akseptorfasen. Derfor diskuteres det videre i oppgaven resultater av ekstraksjonsutbyttene for de 5 resterende modellsubstansene (ikke amiodaron).



Figur 11. Kromatogrammet av basiske stoffer etter LPME med 2-nonanon som SLM og kjøring i HPLC (amiodaron er ikke med i kromatogrammet)

Ut fra strukturene finner man at alle modellsubstansene er relativt upolare stoffer. Resultatene er oppsummert i tabell 11, hvor løsemidlene er rangert i henhold til deres gjennomsnittlige ekstraksjonsutbytte for de fem modellsubstansene (bortsett fra amiodaron som ikke ble ekstrahert). De fem beste løsemiddelkandidatene var 2-nonanon, dodecylacetat, 2-oktanon, isopentylbensen, og 2,2-dimetyl-1-propylbensen (neopentylbensen), som alle ga gjennomsnittlig utbytte på over 49 %. De to sistnevnte løsemidlene har ikke blitt testet i LPME til nå, og kan være interessante alternativer for fremtiden, mens de tre øverste løsemidlene har vært svært lite brukt i tidligere LPME-undersøkelser. En grundig vurdering av både ekstraksjonsutbyttene (tabell 11) og vannløselighetsverdiene (tabell 10) indikerer at særlig dodecylacetat, isopentylbensen og neopentylbensen kan anbefales som egnete alternativer for LPME, og bør kanskje legges mer merke til ved fremtidig implementering av 3-fase LPME ved ekstraksjon av upolare basiske stoffer.

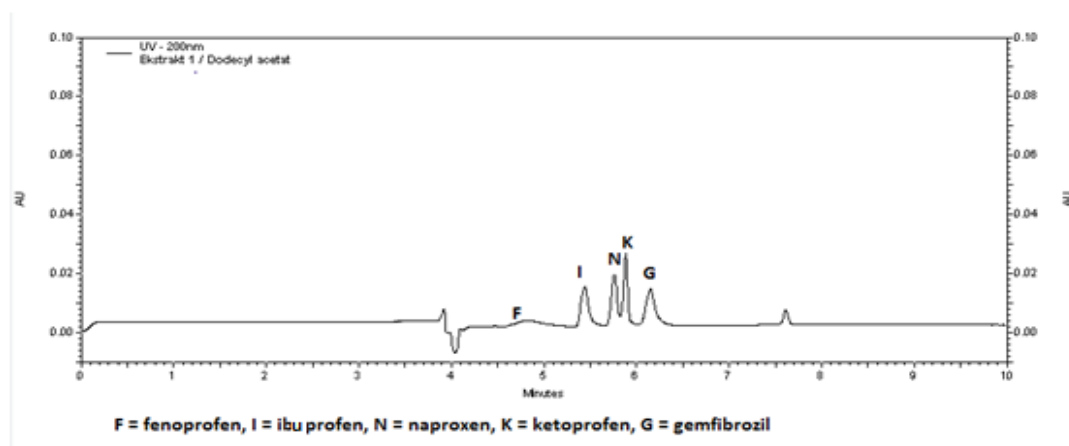
Tabell 11. Utbytterangering av diverse SLM for basiske modellsubstanser

Løsemiddel	Utbytte (%) (n=3) ¹					Gjennomsnitt ²
	Droperidol	Haloperidol	Nortriptylin	Klomipramin	Klemastin	
2-Nonanon	90	62	62	47	58	64
Dodecylacetat	70	64	65	48	62	62
2-Oktanon	85	54	54	41	49	57
Isopentylbensen	55	65	68	41	43	54
Neopentylbensen	39	58	69	40	41	49
Diheksyleter	29	48	50	48	59	47
Dibutylftalat	47	48	53	34	47	46
2-Nitrofenyloktyleter	28	57	64	41	41	46
Fenetol	65	58	40	21	25	42
3-Nitrostyren	65	46	47	21	18	39
Dodekan	nd	24	53	45	48	34
1-Nonanol	68	21	38	15	10	30
1-Oktanol	67	19	35	22	14	29
2-Heksyl-1-dekanol	21	26	40	28	25	28
1-Dekanol	65	20	32	11	8	27
2-Oktyl-1-dodekanol	8	16	30	25	23	20

¹Målt i HPLC, se 3.6.1 i Eksperimentelt, ²Gjennomsnitt av utbyttene for droperidol, haloperidol, nortriptylin, klomipramin og klemastin

4.1.4 Ekstraksjonsutbytte (%) av ulike SLM for sure modellsustanser

I den siste forsøksserien ble de samme 16 løsemidlene testet som SLM for ekstraksjon av utvalgte sure stoffer. I dette tilfellet ble ibuprofen, naproxen, ketoprofen, gemfibrozil og fenoprofen valgt som modellsustanser. Strukturer, pKa- og log P-verdier er oppsummert i Figur 1. Ut fra strukturene ser man at alle disse sure modellsustansene er upolare stoffer. Resultatene er oppsummert i tabell 12, hvor løsemidlene er rangert i henhold til deres gjennomsnittlige ekstraksjonsutbytte for fire av de fem modellsustansene. Fenoprofen er ikke tatt med i resultatene i tabell 12. Dette er på grunn av at toppene av fenoprofen var veldig brede i elektroferogrammene og arealene under dem var ikke pålitelige nok til estimering av utbytte. Figur 12 presenterer et eksempel på en bred topp for fenoprofen ved bruk av dodecylacetat som SLM.



Figur 12. Bred topp for fenoprofen ved bruk av dodecylacetat som SLM

De fem beste kandidatene i dette tilfellet var dodecylacetat, fenetol, isopentylbensen, dibutylftalat og 1-dekanol, som alle ga gjennomsnittlig utbytte på over 73 %. Tre av disse toppkandidatene er nye løsemidler i forbindelse med 3-fase LPME, mens de to andre løsemidlene (dodecylacetat og 1-dekanol) har vært brukt sjelden i tidligere studier. Ved å sette sammen både ekstraksjonsutbytte (tabell 12) og vannløselighet (tabell 10), må særlig dodecylacetat og isopentylbensen kunne anses til å være interessante SLM-kandidater, og bør kanskje legges mer merke til ved fremtidig implementering og optimalisering av 3-fase LPME av upolare sure forbindelser.

Tabell 12. Utbytterangering av ulike SLM for sure modellsubstanser

Løsemiddel	Utbytte (%) (n=3) ¹				
	Ibuprofen	Naproxen	Ketoprofen	Gemfibrozil	Gjennomsnitt ²
Dodecylacetat	83	82	83	79	82
Fenetol	77	78	78	77	77
Isopentylbensen	83	83	61	83	78
Dibutylftalat	76	75	71	75	74
1-Dekanol	74	77	71	70	73
3-Nitrostyren	71	71	74	69	71
1-OKtanol	70	72	69	69	70
Neopentylbensen	70	70	60	70	67
1-Nonanol	68	69	66	58	65
2-nitrofenyloktyleter	68	67	48	71	63
2-heksyl 1-dekanol	60	56	34	55	51
Dodekan	71	52	6	64	48
2-Oktyl 1-dodekanol	43	41	21	42	37
2-Nonanon	14	18	50	11	23
Diheksyleter	8	39	6	2	14
2-Oktanon	nd	nd	nd	nd	nd

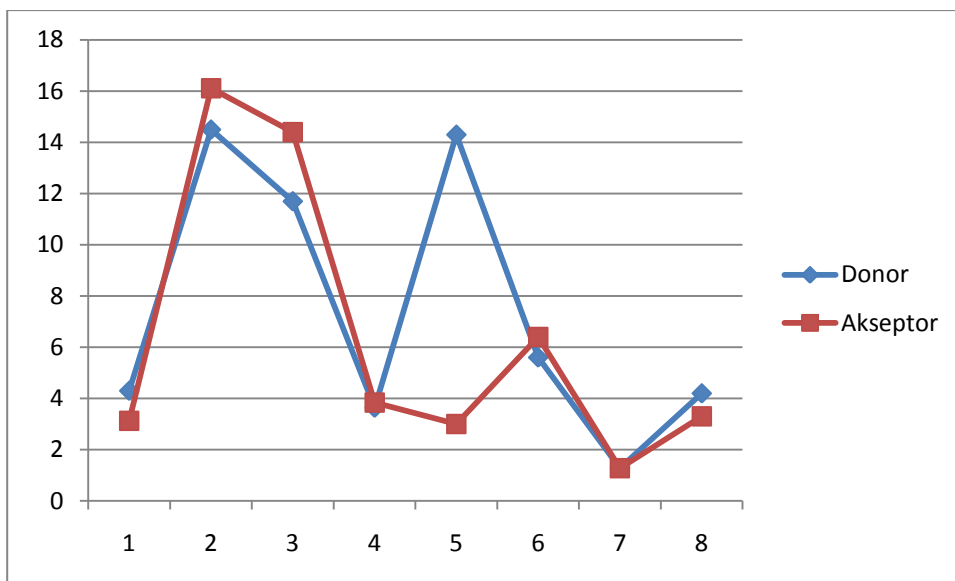
¹Målt ved CE, se 3.5.2 i Eksperimentelt

²Gjennomsnitt av utbytteverdier for ibuprofen, naproxen, ketoprofen og gemfibrozil

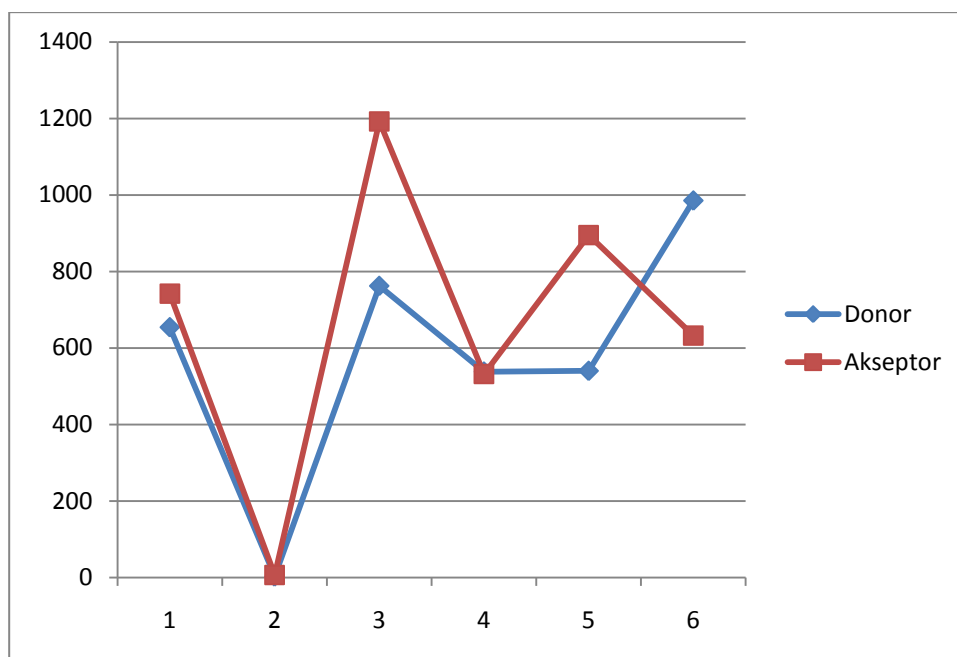
4.2 Optimaliseringsforsøk

4.2.1 Valg av løsningsmiddel for ekstraksjon av donor- og akseptorfase fra LPME i forbindelse med GC/MS

Ved valg av akseptor- og donorfase, er det viktig å tenke på fasenes kompatibilitet i analyseinstrumentet som skal brukes videre. Siden både akseptor- og donorfase i 3-fase LPME er vandige løsninger og dermed ikke flyktige, kan disse ikke injiseres direkte i GC/MS, og derfor ble prøven og akseptorfase tilbakeekstrahert med pentan /sykloheksan som er et kompatibelt løsemiddel for GC/MS. De 3 første organiske løsemidlene (SLM) som ble undersøkt var diheksyleter, 1-oktanol og NPOE. GC/MS-resultatene fra ekstraksjoner i pentan viste store variasjoner. Variasjonen gjaldt både for standardløsningene og ekstraktene. Dette kan være på grunn av at pentan er ganske flyktig og fordampes både under prøveopparbeidelse, og mens vialene i en batch med flere prøver står på vent i instrumentet. Dette er ugunstig og resultatene er ikke pålitelige. Videre i oppgaven ble derfor pentan erstattet med sykloheksan, som er et mindre flyktig løsningsmiddel. Forsøkene for de 3 sistnevnte organiske fasene, nemlig diheksyleter, 1-oktanol og NPOE ble gjort på nytt med sykloheksan. Opplysningene som er presentert i tabell 10, er forsøksresultater med sykloheksan. Figur 13 og 14 viser variasjoner av lekkasje for henholdsvis diheksyleter og 1-oktanol ved bruk av pentan.



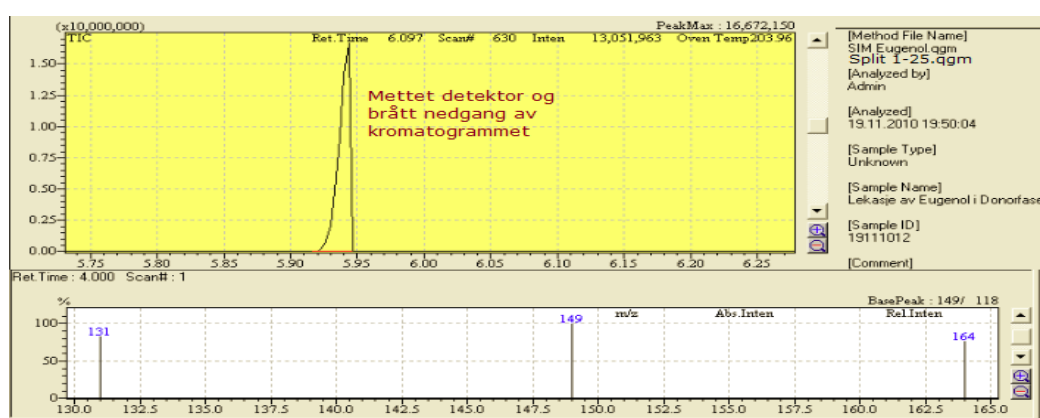
Figur 13. Variasjon i lekkasje ($\mu\text{g/ml}$) av 8 forsøk av diheksyleter ved bruk av pentan



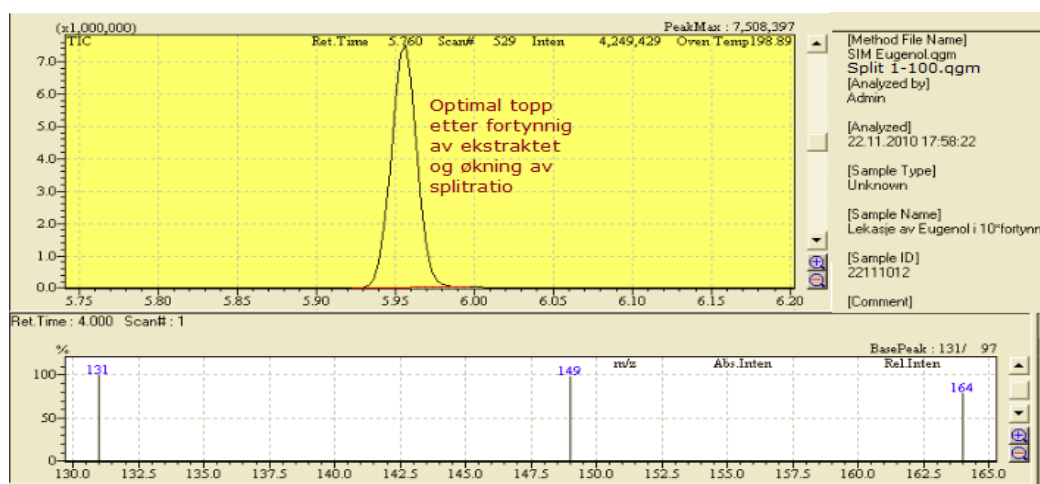
Figur 14. Variasjon i lekkasje ($\mu\text{g/ml}$) av 8 forsøk av 1-oktanol ved bruk av pentan

4.2.2 Fortynning av prøver før injeksjon i GC/MS

For de mest vannløselige organiske løsemidlene, ble lekkasjen særlig i prøveløsningen så stor at den oversteget detektorens deteksjonskapasitet. Detektoren ble mettet, og dermed ble det observert en brå nedgang av kromatogrammet. For å løse dette problemet, ble alle donorfasene fortynnet 10 ganger med sykloheksan før injeksjon i GC/MS, og splitratio på instrumentet ble justert fra 1:25 opp til 1:100. Figur 15 viser et eksempel på brått nedfall av kromatogrammet for eugenol, og figur 16 når tilstanden er optimalisert (10 ganger fortynning og økt splitratio).



Figur 15. Brått nedfall av kromatogrammet på grunn av mettet detektor



Figur 16. Fin kromatogram av eugenol etter fortynning av ekstraktet og økning av splitratio

4.2.3 Valg av fiberbehandlingsmetode ved LPME

Som nevnt tidligere i oppgaven (LPME-metoden), tørkes overskudd av SLM bort med medisinsk tørkepapir rett etter immobiliseringen. Hensikten med å fjerne overskuddet var å minimalisere lekkasjen av organisk fase fra fiberen. Man kan tenke seg at ukontrollert lekkasje av organisk løsemiddel fra fibrene i en forsøksserie kan gi dårligere repeterbarhet og påvirke ekstraksjonsutbyttene. Tidligere studier har vist at utbyttene ble signifikant bedre ved fjerning av overskudd av organisk løsemiddel [20]. For å studere effekten av tørking på lekkasje, ble et sett av eksperimenter etablert slik at ulike fiberbehandlingsmetoder ble testet med hensyn til lekkasjemengden av SLM både i akseptor- og donorfase. De utvalgte organiske løsemidlene var diheksyleter og 1-oktanol, siden de var blant de mest brukte løsemidlene i tidligere LPME-undersøkelser. Følgende metoder for å behandle fiberen etter immobilisering ble testet ut:

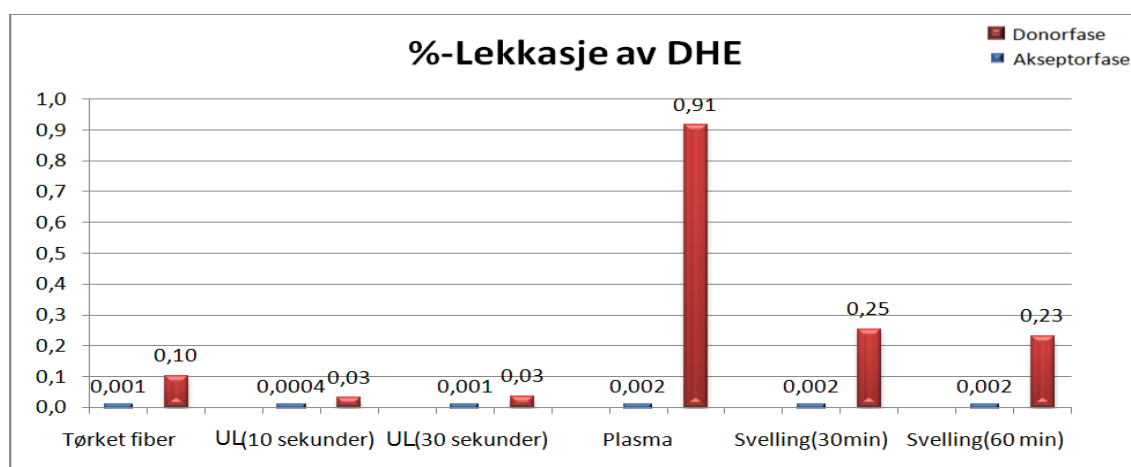
- Tørking av SLM med medisinsk tørkepapir når prøven er vann
- Tørking av SLM med medisinsk tørkepapir når prøven er plasma
- Bruk av ultralydbad i 10 og 30 sekunder etter immobilisering for å fjerne overskudd av løsemiddel i stedet for tørkepapir
- Svelling av hulfiberen ved å la den ligge på benken i fri luft i 30 og 60 minutter etter immobilisering (hulfiberen er en polymer som vil svelle etter at porene blir fylt med en væske).

Figur 17 og 18 viser % lekkasje (w/w) av henholdsvis diheksyleter og 1-oktanol. Bruk av ultralydbad kan gi noe varierende effekt på lekkasje. Ut fra figur 17 kan man observere at lekkasjen av SLM reduseres for diheksyleter, mens figur 18 tilsier at lekkasjen av 1-oktanol blir nesten uforandret. Disse varierende resultatene tyder på at den tradisjonelle papirtørkingen kanskje fortsatt er det beste alternativet for fjerning av overskudd av SLM på fiberen etter immobilisering.

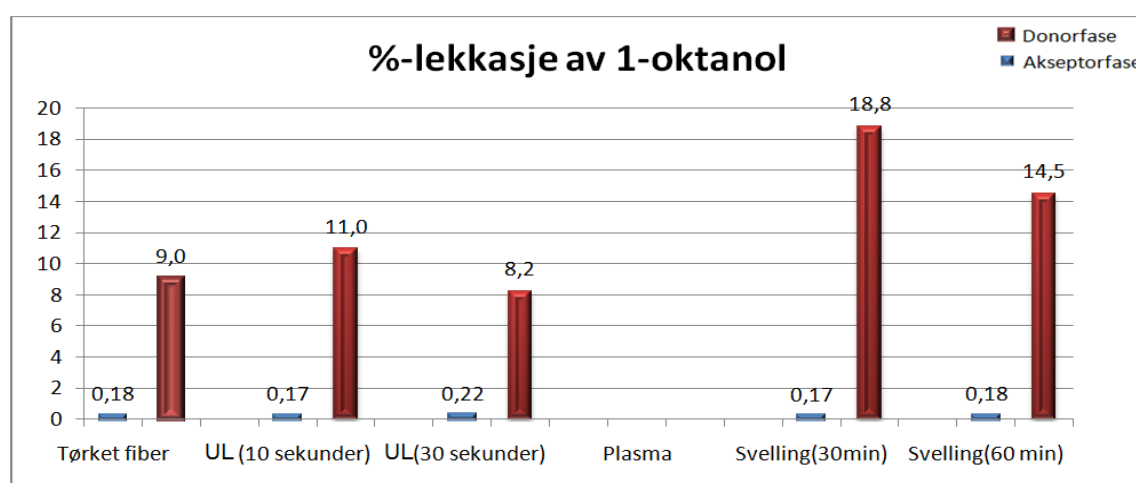
Resultatene i figur 17 og 18 viser at svelling av polypropylenfiberen ikke har noen særlig forbedringseffekt på stabiliteten av SLM i hulfiberen. Teorien var at en polymer vil svelle hvis den er i kontakt med en væske. Denne kan fange opp SLM i hulfiberen, og dermed redusere lekkasjen ytterligere. Resultatene i figur 17 og figur 18 tyder på det

motsatte av teorien. Lekkasje av SLM i prøveløsningen har til og med økt etter 30 og 60 minutter svelling. For akseptorfasen observeres nesten ingen forandring i % lekkasje ved bruk av svellingsmetoden.

Ut fra figur 17 øker lekkasjen av SLM ved bruk av plasma som donorfase (dette ble ikke testet for 1-oktanol). Dette fenomenet var forventet på grunn av at plasma inneholder ulike surfaktanter som øker løseligheten av SLM og resulterer dermed i økt lekkasje i prøveløsningen.



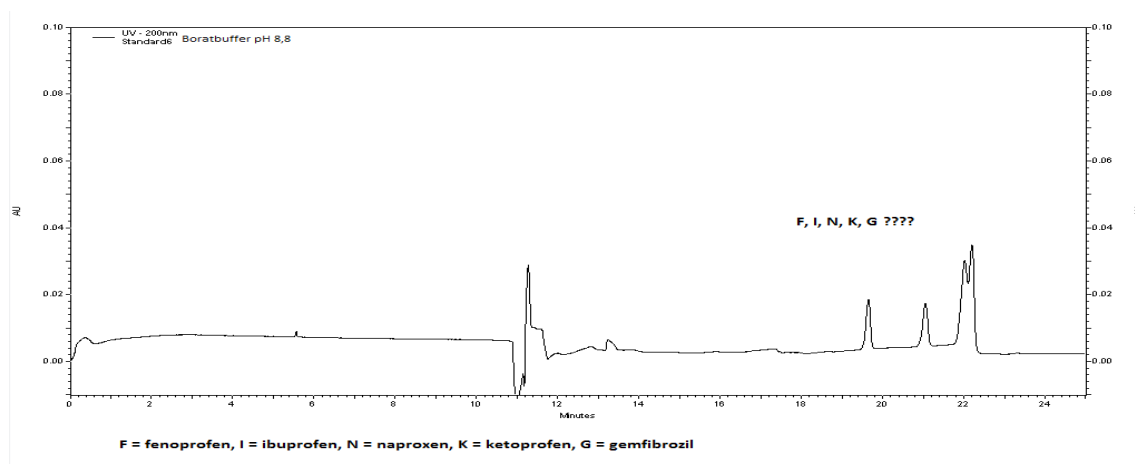
Figur 17. %-lekkasje (w/w) av diheksyleter ved ulike fiberbehandlingsmetoder



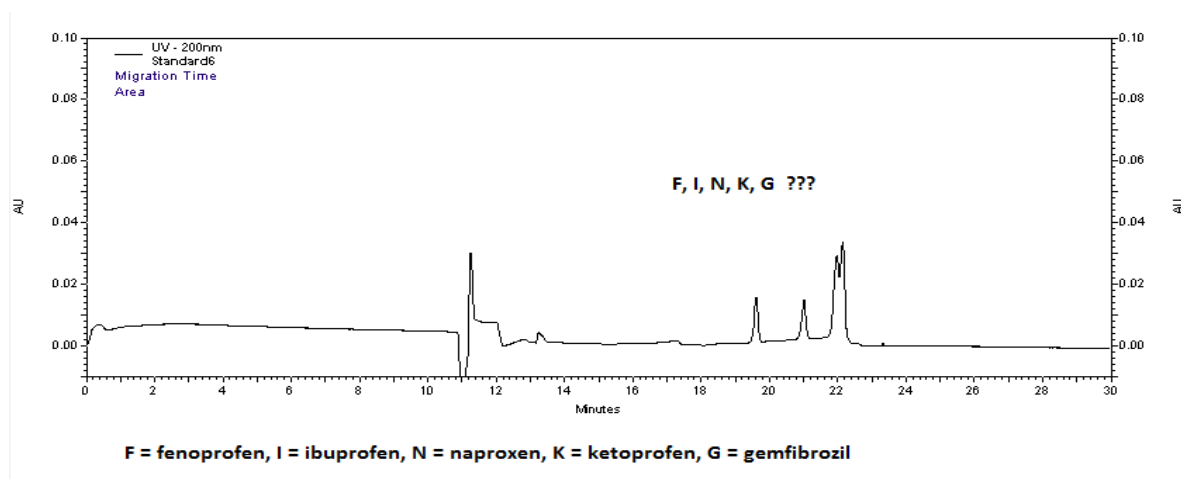
Figur 18. %-lekkasje (w/w) av 1-oktanol ved ulike fiberbehandlingsmetoder

4.2.4 Valg og optimalisering av separasjonsbuffer for CE

For å få separert de 5 utvalgte sure modellsubstansene i CE, ble forskjellige separasjonsbuffer testet ut. Natriumboratbuffer med pH rundt 2-3 enheter høyere en pKa-verdiene til modellsubstansene har ofte vært valgt som separasjonsbuffer [26]. Da vil organiske syrer være ionisert og vil dermed kunne separeres i CE når det settes på høyspenning. Figur 19 og 20 viser henholdsvis elektroferogrammene av sure stoffer ved bruk av 50 mM boratbuffer pH = 8,8 og 50 mM natriumboratbuffer pH = 8,5. Ut fra figurene ser man at separasjon av modellsubstansene ikke har vært optimal ved bruk av boratbuffere.

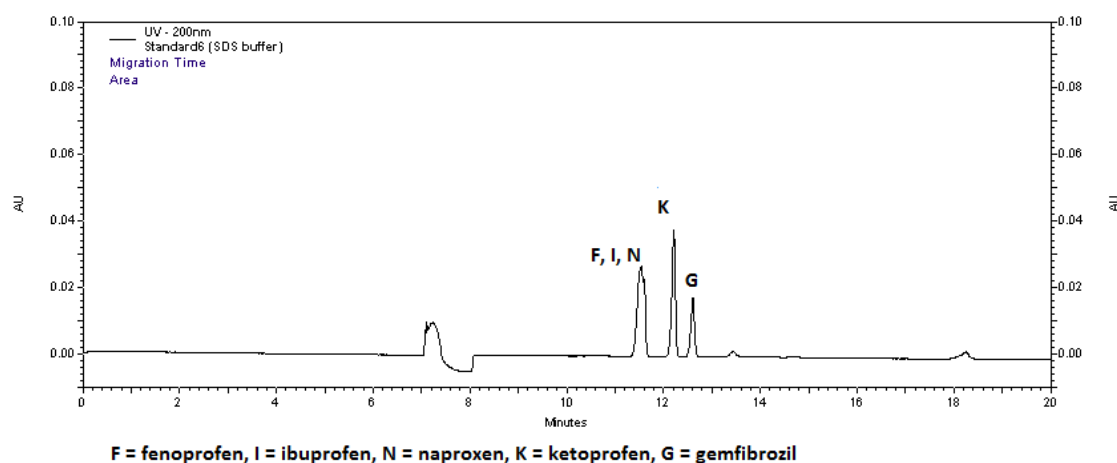


Figur 19. Overlapping og uklar separasjon av 5 modellsubstanser ved bruk av boratbuffer pH = 8,8



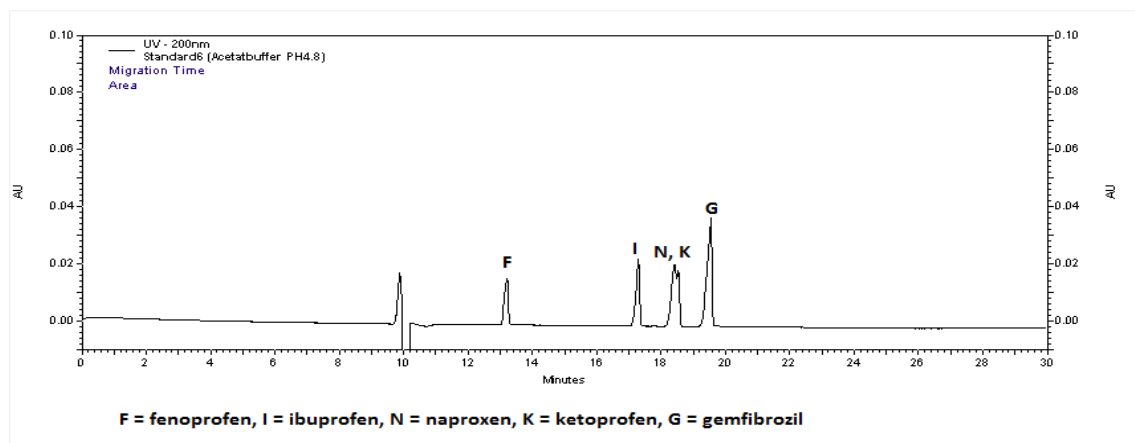
Figur 20. Overlapping av stoffer og uklar separasjon av 5 modellsubstanser ved bruk av natriumboratbuffer pH = 8,5

Videre ble en 20 mM fosfatbuffer med beta-syklodeksterin med pH 9 testet ut [25]. Figur 21 viser elektroferogrammet av modellsubstansene ved bruk av fosfatbuffer med beta-syklodeksterin. Ut fra figuren observeres det at separasjon av de sure modellsubstansene ikke har vært optimal ved bruk av denne bufferen, da fenoprofen, ibuprofen og naproxen overlapper og kommer under samme topp.

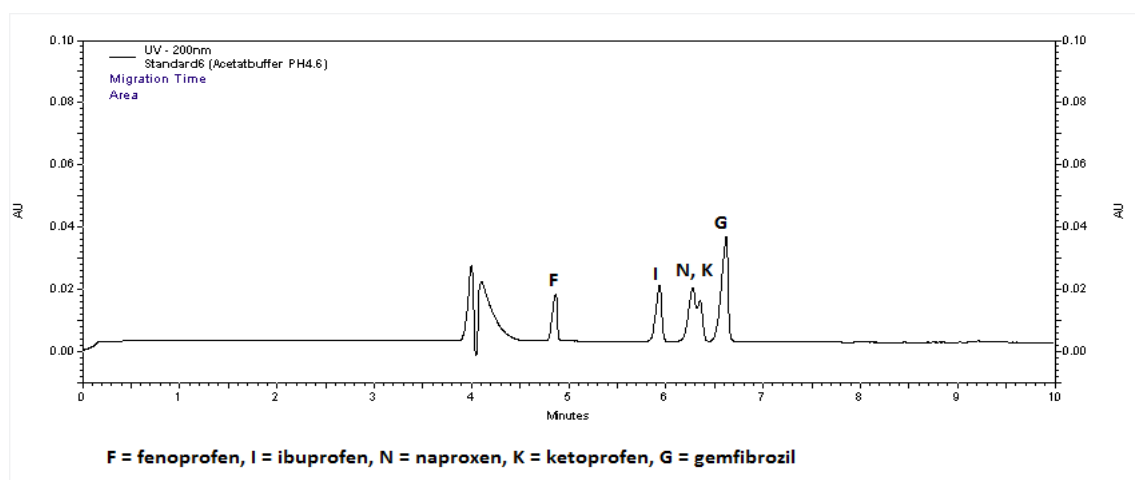


Figur 21. Overlapping av fenoprofen, ibuprofen og naproxen ved bruk av fosfatbuffer med beta-syklodeksterin pH = 9

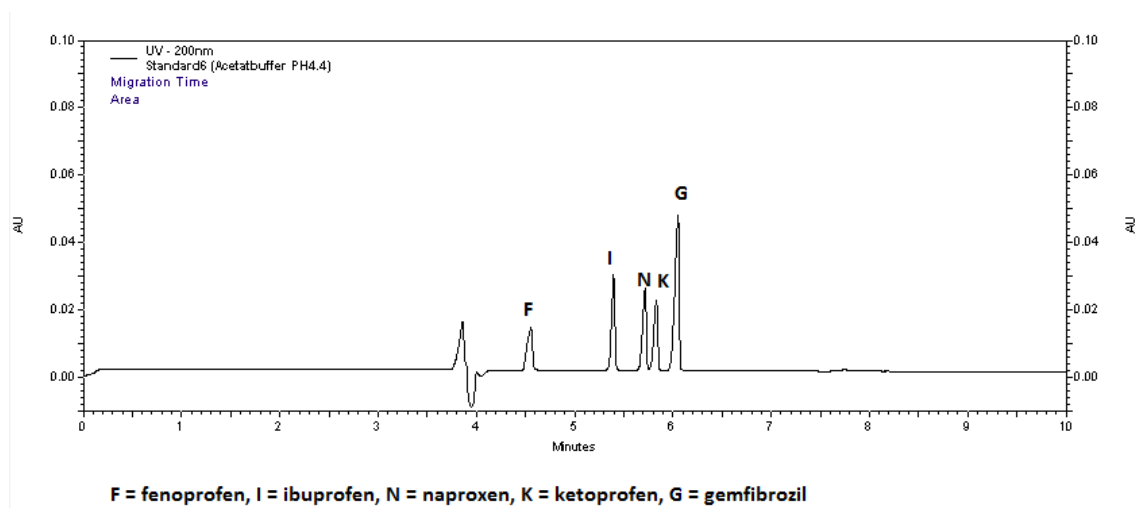
Siden bruk av separasjonsbuffer med pH over modellsubstansenes pKa-verdi ikke ga optimale resultater, ble separasjonsbuffer med lavere pH-verdier enn pKa-verdier for modellsubstansene undersøkt. I denne oppgaven ble 100 mM acetatbuffer med pH = 4,8; pH = 4,6 og pH = 4,4 testet ut [18]. Figurene 22, 23 og 24 viser at separasjon av modellsubstansene er optimal ved pH = 4,4. Det som er interessant, er at i tillegg til optimal separasjon, vil man oppnå mye kortere separasjonstid også ved bruk av acetatbuffer med pH 4,4. Elektroferogrammene viser at separasjonstiden er redusert fra 20 minutter ned til 6,5 minutter.



Figur 22. Overlapping av naproxen og ketoprofen ved bruk av acetatbuffer pH = 4,8



Figur 23. Overlapping av naproxen og ketoprofen ved bruk av acetatbuffer pH = 4,6



Figur 24. Optimal separasjon av modellsubstansene ved bruk av acetatbuffer pH = 4,4

4.3 Karakterisering av modellsubstanser i forhold til Snyders klassifikasjonssystem for løsemidler

En nærmere undersøkelse på resultatene i tabell 11 og 12 avklarer flere viktige aspekter. De sure modellsubstansene viser generelt høyere utbytte sammenlignet med de basiske modellsubstansene. Grunnen til dette er sannsynligvis høyere polaritet av de sure modellsubstansene enn de basiske modellsubstansene. Tidligere erfaringer [17] tyder på at ekstraksjonsutbytte i 3-fase LPME er høyest for analytter med log P i området 2-4. Utbytte reduseres for analytter med log P-verdi over 4. Ut fra tabell 1 ser man at de basiske modellsubstansene i denne oppgaven er svært hydrofobe (log P i området 3.10 til 5.30). Derfor er ekstraksjonen fra organiske væskemembraner (SLM) inn i den vandige akseptorfasen begrenset. Dette gjør at valg av løsemiddel for basiske substanser er kritisk. Ekstraksjonsutbytte til hvert løsemiddel ble kontrollert mot Snyders klassifikasjonssystem for løsemidler [27]. De alle tre øverste løsemidlene, nemlig 2-nonanon, dodecylacetat, og 2-oktanon tilhører klasse VI (alifatisk ketoner og estere), og de to neste løsemidlene er under klasse VII (aromatiske hydrokarboner) av Snyders klassifiseringssystem for løsemidler. Selv om det er relativt ulike former av kjemiske struktur mellom klasse VI og VII av Snyders løsemidler, ligger de likevel nær hverandre med tanke på løsemidlenes selektivitet, og begge gruppene har relativt sterke protonakseptor og dipol egenskaper. Dodekan som står i midten av Tabell 11, tilhører klasse I av Snyders løsemidler (alifatisk difenyletere), mens alifatiske alkoholer (tilhører klasse II) ble funnet på bunnen av Tabell 11 (1-dekanol, 1-nonanol og 1-oktanol). Dermed ble klasse II av Snyders løsemidler funnet å gi lav utbytte for hydrofobe basiske substanser. Interessant nok var at et tilbakeblikk til rapporter i litteraturen viser at bruk av klasse I og II løsemidler har vært populært i 3-fase LPME av upolare basiske legemidler [6]. Klasse VI eller VII av Snyders løsemidler bør derfor prøves mer ved fremtidig implementering av 3-fase LPME for basiske modellsubstanser.

Ut fra tabell 2 og tabell 12 for sure modellsubstanser, ser man at disse analyttene var mindre hydrofobe (log P-verdier i området 2,88 til 4,30), og dermed er det lettere å ekstrahere dem fra den organiske væskemembranen inn i den vandige akseptorfasen. Selektiviteten av løsemidler er derfor mindre kritisk for disse analyttene. Dette bekreftes

i tabell 12 slik at de sju øverste løsemidlene, som alle ga gjennomsnittlig utbytte på 70 % eller mer, tilhører ulike klasser (VI, I, VII, og II) av Snyder klassifikasjonssystem, og er løsemidler med betydelige forskjeller med tanke på løsemidlets selektivitet, protonakseptor, protoondonor, og dipol egenskaper.

Konklusjon

Det foreliggende arbeidet har for første gang systematisk undersøkt stabiliteten av ulike organiske løsemidler som brukes som SLM i 3-fase hulfiber væske-fase mikroekstraksjon (LPME). Organiske løsemidler immobiliseres i porene av en porøs hulfiber, og skiller som en barriere den vandige prøven fra den vandige akseptorfase. Disse løsemidlene kan bli redusert før ekstraksjon på grunn av fordamping av løsemidler i kontakt med luft, eller under ekstraksjon på grunn delvis oppløsning i de vandige fasene. Ingen fordamping av SLM ble oppdaget i løpet av 5 minutters eksponering i friluft før LPME for løsemidler med kokepunkt over cirka 225 °C. Derfor ble disse løsemidlene funnet å være hensiktsmessige stabile løsemidler, som kan anbefales ved fremtidig implementering og optimalisering av LPME. I tillegg til denne kokepunktanbefalingen, bør vannløselighet av løsemidlet fortrinnsvis være under 100 µg/ml. For denne typen løsemiddel, var lekkasje av SLM i prøven og akseptorfase ubetydelig, og mer enn 97 - 99 % (w/w) av SLM var intakt etter LPME-prosessen. I tillegg har dette arbeidet også vist at valg av type løsemiddel som brukes som SLM bør være relatert til hydrofobisitet av analytten. Hvis log P er høyere enn ca 4, er selektivitet av løsemidlet viktig for ekstraksjon av analytten fra SLM inn i vandig akseptorfase. For basiske substanser i slike tilfeller bør løsemidler som tilhører gruppe VI (alifatisk ketoner og estere) eller VII (aromatiske hydrokarboner) av Snyders klassifikasjonssystem for løsemidler testes. På den annen side, hvis log P for analytten er i størrelsesorden 2-4, synes selektivitet av løsemiddelet å være mindre viktig. Til slutt har dette arbeidet lansert flere nye og svært stabile løsemidler, blant annet dibutylftalat, 3-nitrostyren, isopentylbensen, fenetol, og neopentylbensen som bør undersøkes nærmere i fremtidige LPME-applikasjoner.

5 Kildeliste

1. Ho, T.S., S. Pedersen-Bjergaard, and K.E. Rasmussen, *Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction - Comparison with conventional liquid-liquid extraction*. Journal of Chromatography A, 2002. **963**(1-2): p. 3-17.
2. Lee, J.Y., et al., *Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: A review*. Analytica Chimica Acta, 2008. **624**(2): p. 253-268.
3. Jeannot, M.A. and F.F. Cantwell, *Solvent microextraction into a single drop*. Analytical Chemistry, 1996. **68**(13): p. 2236-2240.
4. Halvorsen, T.G., S. Pedersen-Bjergaard, and K.E. Rasmussen, *Reduction of extraction times in liquid-phase microextraction*. Journal of Chromatography B, 2001. **760**(2): p. 219-226.
5. Psillakis, E. and N. Kalogerakis, *Developments in single-drop microextraction*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2002. **21**(1): p. 53-63.
6. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction*. Journal of Chromatography A, 2008. **1184**(1-2): p. 132-142.
7. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Liquid-phase microextraction utilising plant oils as intermediate extraction medium - Towards elimination of synthetic organic solvents in sample preparation*. Journal of Separation Science, 2004. **27**(17-18): p. 1511-1516.
8. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis*. Analytical Chemistry, 1999. **71**(14): p. 2650-2656.
9. Zhu, L.Y., L. Zhu, and H.K. Lee, *Liquid-liquid-liquid microextraction of nitrophenols with a hollow fiber membrane prior to capillary liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 2001. **924**(1-2): p. 407-414.
10. Quintana, J.B., R. Rodil, and T. Reemtsma, *Suitability of hollow fibre liquid-phase microextraction for the determination of acidic pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry without matrix effects*. Journal of Chromatography A, 2004. **1061**(1): p. 19-26.
11. Uglund, H.G., M. Krogh, and L. Reubsæet, *Three-phase liquid-phase microextraction of weakly basic drugs from whole blood*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2003. **798**(1): p. 127-135.

12. Halvorsen, T.G., et al., *Liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography-mass spectrometry. Extraction from small volumes of biological samples*. Journal of Separation Science, 2003. **26**(17): p. 1520-1526.
13. Ho, T.S., et al., *Liquid-phase microextraction based on carrier mediated transport combined with liquid chromatography-mass spectrometry - New concept for the determination of polar drugs in a single drop of human plasma*. Journal of Chromatography A, 2005. **1072**(1): p. 29-36.
14. Bjorhovde, A., et al., *Liquid-phase microextraction of drugs from human breast milk*. Analytica Chimica Acta, 2003. **491**(2): p. 155-161.
15. Halvorsen, T.G., S. Pedersen-Bjergaard, and K.E. Rasmussen, *Liquid-phase microextraction and capillary electrophoresis of citalopram, an antidepressant drug*. Journal of Chromatography A, 2001. **909**(1): p. 87-93.
16. Ho, T.S., et al., *Liquid-phase microextraction of hydrophilic drugs by carrier-mediated transport*. Journal of Chromatography A, 2003. **998**(1-2): p. 61-72.
17. Pedersen-Bjergaard, S., et al., *Liquid-phase microextraction of basic drugs - Selection of extraction mode based on computer calculated solubility data*. Journal of Separation Science, 2005. **28**(11): p. 1195-1203.
18. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Liquid-phase microextraction and capillary electrophoresis of acidic drugs*. Electrophoresis, 2000. **21**(3): p. 579-585.
19. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2005. **817**(1): p. 3-12.
20. Bårdstu, K.F., *Optimalisering av 3-fase væskefasemikroekstraksjon*, 2006, The University of Oslo: Oslo.
21. Wu, J.M. and H.K. Lee, *Orthogonal array designs for the optimization of liquid-liquid-liquid microextraction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs combined with high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection*. Journal of Chromatography A, 2005. **1092**(2): p. 182-190.
22. Ho, T.S., S. Pedersen-Bjergaard, and K.E. Rasmussen, *Liquid-phase microextraction of protein-bound drugs under non-equilibrium conditions*. Analyst, 2002. **127**(5): p. 608-613.
23. Rasmussen, K.E. and S. Pedersen-Bjergaard, *Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2004. **23**(1): p. 1-10.
24. Zorita, S., T. Barri, and L. Mathiasson, *A novel hollow-fibre microporous membrane liquid-liquid extraction for determination of free 4-isobutylacetophenone*

concentration at ultra trace level in environmental aqueous samples. Journal of Chromatography A, 2007. **1157**(1-2): p. 30-37.

25. Mardones, C., A. Rios, and M. Valcarcel, *Determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in biological fluids by automatic on-line integration of solid-phase extraction and capillary electrophoresis.* Electrophoresis, 2001. **22**(3): p. 484-490.

26. Altria, K.D., *Analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis* 1998, Braunschweig/Wiesbaden: Vieweg. XII, 285 s.

27. Snyder, L.R., *CLASSIFICATION OF SOLVENT PROPERTIES OF COMMON LIQUIDS.* Journal of Chromatographic Science, 1978. **16**(6): p. 223-234.